

**Calciumphosphat-Nanopartikel  
als fluoreszierendes Material  
und zur elektrophoretischen Beschichtung  
nanostrukturierter Oberflächen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

vorgelegt von

**Manuel Neumeier**

geboren in Lübeck

Institut für Anorganische Chemie

der

Universität Duisburg-Essen

**2011**

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2008 bis Dezember 2010 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Matthias Epple im Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Matthias Epple

Prof. Dr. Axel Schönbucher

Vorsitzender: Prof. Dr. Karin Stachelscheid

Tag der Disputation: 24.02.2011



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Theoretischer Hintergrund.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Nanopartikel.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Stabilität kolloidaler Systeme.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Methoden.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Rasterelektronenmikroskopie.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2. Transmissionselektronenmikroskopie.....</b>	<b>12</b>
<b>3.3. Dynamische Lichtstreuung.....</b>	<b>13</b>
3.3.1. Bestimmung der Teilchengröße.....	13
3.3.2. Zetapotential.....	14
<b>3.4. Scheibenzentrifuge.....</b>	<b>15</b>
<b>3.5. Röntgenbeugung.....</b>	<b>16</b>
<b>3.6. Fluoreszenzspektroskopie.....</b>	<b>17</b>
<b>3.7. Thermogravimetrie.....</b>	<b>18</b>
<b>3.8. UV/Vis-Spektroskopie.....</b>	<b>18</b>
<b>3.9. Infrarotspektroskopie.....</b>	<b>19</b>
<b>3.10. Atomabsorptionsspektroskopie.....</b>	<b>19</b>
<b>4. Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Lanthanoid-dotierte Hydroxylapatit-Nanopartikel.....</b>	<b>21</b>
4.1.1. Experimenteller Teil.....	22
4.1.2. Hydroxylapatit-Nanopartikel, dotiert mit Europium.....	23
4.1.3. Hydroxylapatit-Nanopartikel, dotiert mit Terbium.....	34
4.1.4. Hydroxylapatit-Nanopartikel, dotiert mit Dysprosium.....	42
4.1.5. Lanthanoid-dotierte Kern-Schale-Hydroxylapatit-Nanopartikel.....	48
4.1.6. Experimenteller Teil.....	49
4.1.7. Ummantelung der Lanthanoid-dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikel mit	

einer Silikatschale durch die Kondensation von TEOS.....	50
4.1.8. Zusammenfassung.....	72
<b>4.2. Stabilität von Calciumphosphat-DNA-Nanopartikeln.....</b>	<b>74</b>
4.2.1. Experimenteller Teil.....	75
4.2.2. Charakterisierung der Calciumphosphat-DNA-Nanopartikel.....	76
4.2.3. Quantifizierung der an der Partikeloberfläche adsorbierten DNA.....	79
4.2.4. Vergleich der DNA-Quantifizierung mit PicoGreen® und über die UV-Absorption.....	85
4.2.5. Zusammenfassung.....	87
<b>4.3. Beschichtung von nanostrukturierten Siliciumwafern mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln.....</b>	<b>88</b>
4.3.1. Experimenteller Teil.....	90
4.3.2. Nanostrukturierte Siliciumwafer.....	91
4.3.3. Charakterisierung der PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.....	92
4.3.4. Beschichtung von nanostrukturierten Si-Wafern mit Goldnanopartikeln.....	98
4.3.5. Einfluss der Abscheidespannung und -zeit auf die Beschichtung nanostrukturierter Si-Wafer.....	100
4.3.6. Abtrennung der überschüssigen Nanopartikel.....	105
4.3.7. Elektrophoretische Beschichtung mit einer Mischspannung und bei erhöhter Dispersionstemperatur.....	109
4.3.8. Funktionalisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel mit fluoreszierendem Polyethylenimin.....	119
4.3.9. Zusammenfassung.....	129
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>132</b>
<b>6. Literatur.....</b>	<b>135</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>144</b>

<b>7.1. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>144</b>
<b>7.2. Publikationsliste.....</b>	<b>145</b>
<b>7.3. Lebenslauf.....</b>	<b>148</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>149</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>150</b>

### 1. Einleitung

Der Begriff „Nano“ ist seit einigen Jahren in nahezu alle Bereiche des Alltagslebens eingedrungen. Vor allem die Werbung nutzt diesen Begriff, um die Verkaufszahlen zu erhöhen. So werden Kühlschränke damit beworben, dass sie mit Nanosilber beschichtet sind, welches eine antibakterielle Wirkung hat. Auch Sportkleidung, die mit Nanosilber ausgestattet ist, hat gegenüber der herkömmlichen Sportkleidung einen Vorteil, da das Silber geruchshemmend wirkt. Man kann sein Haus mit schmutzabweisender Farbe streichen, die durch den Zusatz von Nanopartikeln den sogenannten Lotus-Effekt nutzt, der Autolack wird durch Nanotechnologie kratzfester. Auch Produkte, die schon seit langer Zeit Nanopartikel nutzen, werden neuerdings mit der Vorsilbe Nano beworben, wie viele Pigmente.

Aber auch in der Forschung ist das Interesse an Nanotechnologie ungebrochen. In vielen Bereichen verspricht man sich Verbesserungen durch die Verwendung von Nanopartikeln. Hierzu zählt vor allem die Halbleitertechnologie. Durch die Verwendung von Nanopartikeln lassen sich bessere Transistoren herstellen<sup>[1-3]</sup> und der Wirkungsgrad von Solarzellen lässt sich erhöhen.<sup>[4-6]</sup> Aber auch LEDs können durch die Verwendung von Nanopartikeln verbessert werden.<sup>[7, 8]</sup>

Auch in der Medizin und Biologie ist das Forschungsinteresse an Nanopartikeln sehr groß. Polymerkapseln im Nanometermaßstab können als Wirkstoffträgersystem verwendet werden. Durch eine gezielte Steuerung der Kapseln wird der Wirkstoff nur dort freigesetzt, wo er benötigt wird, so dass die benötigte Wirkstoffmenge deutlich reduziert werden kann. Magnetische Nanopartikel können zur Bekämpfung von Tumoren, aber auch als Sonden in der Diagnostik eingesetzt werden. Fluoreszierende Nanopartikel können ebenfalls in der Diagnostik eingesetzt werden. Durch die Funktionalisierung mit Proteinen oder Antikörpern können so spezifische Prozesse beobachtet werden. In der Gentherapie können Nanopartikel als Trägersysteme für Nukleinsäuren verwendet werden, so dass die riskanten viralen Trägersysteme abge-

löst werden können. In der Implantologie kann durch die gezielte Nano- und Mikrostrukturierung der Implantate das Zellwachstum an den Implantaten gesteuert werden, so dass die Implantate besser mit dem Knochen verwachsen.

In dieser Arbeit werden verschiedene Möglichkeiten zur Verwendung von Calciumphosphat-Nanopartikeln aufgezeigt. Calciumphosphat in Form von Hydroxylapatit ist der anorganische Bestandteil des Knochens von Wirbeltieren. Es ist als biokompatibles Material von großem Interesse im medizinischen Bereich. Durch die Dotierung mit Lanthaniden können fluoreszierende Nanopartikel dargestellt werden können, die als Sonden in der Diagnostik Einsatz finden können. In Kapitel 4.1 werden Möglichkeiten beschrieben, die Fluoreszenzintensität solcher Partikel zu erhöhen. Bei der Zelltransfektion dienen Calciumphosphat-Nanopartikel als Trägersystem für Nukleinsäuren. Kapitel 4.2 zeigt Untersuchungen zur Stabilität DNA-funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel und zum Adsorptionsverhalten von DNA an der Partikeloberfläche. Im letzten Teil wird die elektrophoretische Beschichtung von nanostrukturierten Siliciumwafern mit Calciumphosphat-Nanopartikeln untersucht. Diese Wafer sollen als Stempel dienen, um bioaktive, nanostrukturierte Alginatgele herzustellen und die Reaktion von Zellen auf solche Nanostrukturen zu untersuchen.

## 2. Theoretischer Hintergrund

### 2.1. Nanopartikel

Die Definition von Nanopartikeln über einen Größenbereich variiert von 1-100 nm bis zu einer Obergrenze von 1000 nm.<sup>[9]</sup> Allgemein stellen Nanopartikel einen Bereich dar, der zwischen einzelnen Molekülen oder Teilchen und der Volumenphase eines Materials liegt. So weisen Nanopartikel zum Teil völlig andere Eigenschaften auf als das makroskopische Material.<sup>[10, 11]</sup> Aufgrund der hohen spezifischen Oberfläche von Nanopartikeln spielen die Oberflächeneigenschaften eine größere Rolle als die Festkörpereigenschaften. Bei Metall- oder Halbleiternanopartikeln verändert sich zudem die Bandstruktur.<sup>[12, 13]</sup> Liegen Nanopartikel fein verteilt in einem kontinuierlichen Medium vor, so spricht man von einem kolloidalen System oder einer Dispersion. In kolloidalen Systemen können sowohl die disperse Phase, also die Kolloide, als auch die kontinuierliche Phase in festem, flüssigem oder gasförmigen Zustand vorliegen. Dabei sind fast alle Kombinationen dieser Zustände möglich. Tabelle 1 zeigt einige Beispiele.

Tabelle 1: Verschiedene kolloidale Systeme<sup>[14]</sup>

Dispersionsmittel	Disperse Phase	Bezeichnung
Gas	Feststoff	Festes Aerosol
Gas	Flüssigkeit	Flüssiges Aerosol
Flüssigkeit	Feststoff	Suspension
Flüssigkeit	Flüssigkeit	Emulsion
Flüssigkeit	Gas	Flüssiger Schaum
Feststoff	Feststoff	Festes Sol
Feststoff	Flüssigkeit	Feste Emulsion
Feststoff	Gas	Fester Schaum

Es gibt zwei Methoden, um Nanopartikel herzustellen: Beim Top-Down-Verfahren

wird die Volumenphase eines Materials durch physikalische Methoden zu Nanopartikeln zerkleinert. Das Bottom-Up-Verfahren geht von molekularen oder ionischen Ausgangsverbindungen aus, aus denen auf chemischem Wege Nanopartikel synthetisiert werden.

### 2.2. Stabilität kolloidaler Systeme

Beim Übergang von der makroskopischen Phasen zur kolloidalen Phase vergrößert sich die spezifische Oberfläche der einzelnen Teilchen. Dies führt zu einer Erhöhung der freien Energie des Systems. Da alle Systeme bei konstanter Temperatur dazu tendieren, den Zustand geringster freier Energie einzunehmen, sind kolloidale Systeme thermodynamisch instabil. Trotzdem kann ein kolloidales System, abhängig von den Wechselwirkungskräften zwischen den einzelnen Teilchen, über einen gewissen Zeitraum stabil sein. Die anziehenden Wechselwirkungen, die van-der-Waals Kräfte, beruhen auf Dipolwechselwirkungen zwischen den Teilchen. Die abstoßenden Wechselwirkungen beruhen auf dem Aufbau einer elektrostatischen Doppelschicht an der Oberfläche der Teilchen. Bei der Dispersion von Teilchen lagern sich Ionen an die Partikeloberfläche an, um die Oberflächenladung der Teilchen zu kompensieren. Die Schicht aus angelagerten Ionen wird als elektrostatische Doppelschicht bezeichnet und besteht aus einer starr an der Partikeloberfläche adsorbierten Schicht, der Stern-Schicht, und einer diffusen Schicht. Die Ionen in der diffusen Schicht sind nur locker an die Teilchen gebunden, die Ionenverteilung ändert sich mit wachsendem Abstand zur Oberfläche, bis die Zusammensetzung der kontinuierlichen Phase erreicht wird. Bei der Bewegung der Teilchen durch das Medium bewegt sich ein Teil der diffusen Schicht, die Scherschicht, mit den Teilchen mit. Die Potentialdifferenz zwischen dieser Scherschicht und der kontinuierlichen Phase wird als Zetapotential bezeichnet und ist ein Maß für die elektrostatische Stabilität der Teilchen.<sup>[15]</sup>

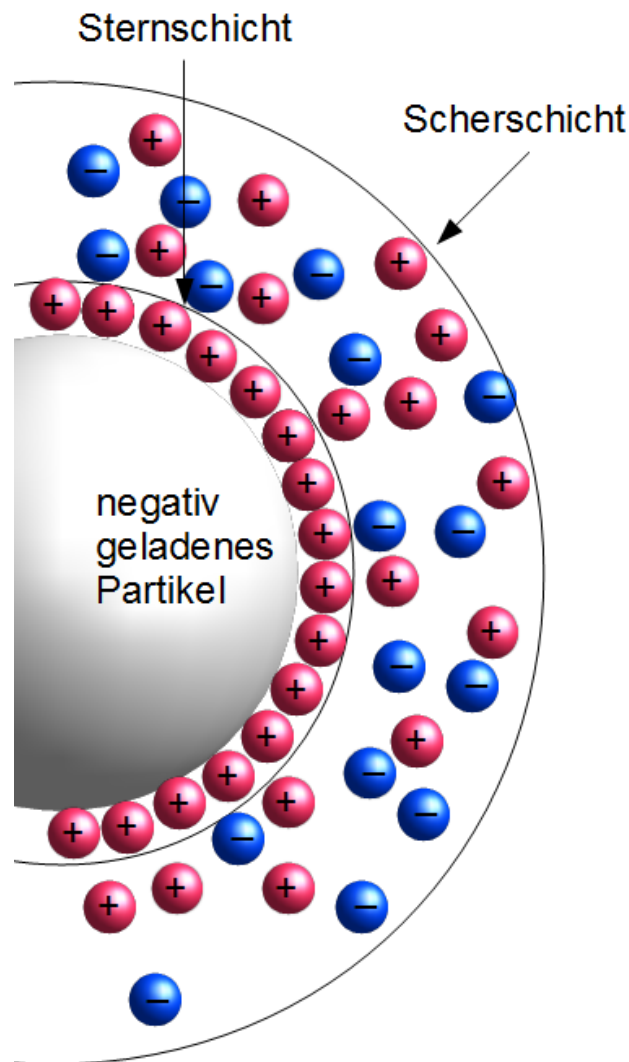


Abbildung 1: Schematische Darstellung der elektrostatischen Doppelschicht mit der Scherschicht.

Das Zetapotential kann aus der elektrophoretischen Mobilität der Teilchen berechnet werden. Wenn das Zetapotential betragsmässig größer als  $\pm 30$  mV ist, so spricht man von einer stabilen Dispersion. Zwischen -30 mV und +30 mV ist die elektrostatische Abstoßung zu gering, so dass die Teilchen koagulieren und ausflocken.

In der DLVO-Theorie (nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek) wird die gesamte Wechselwirkungskraft zwischen den Teilchen als Überlagerung der attraktiven



und repulsiven Wechselwirkungen beschrieben.<sup>[16]</sup>

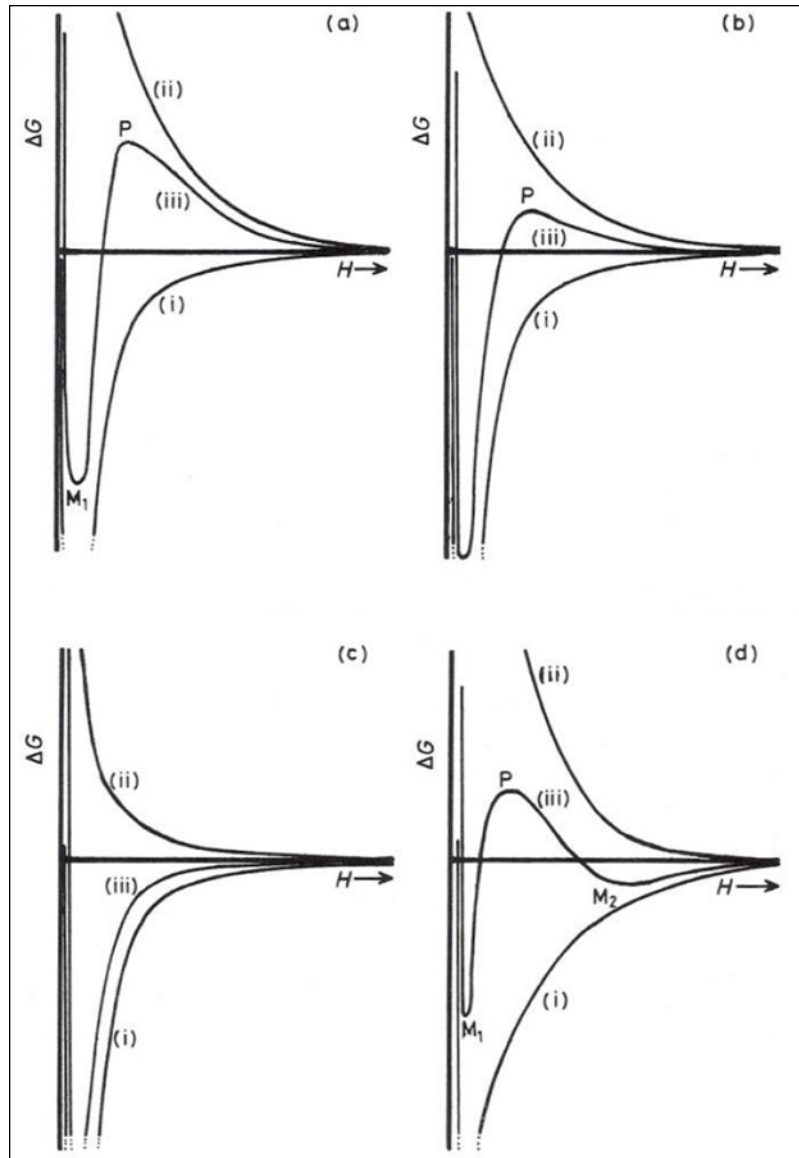


Abbildung 2: Graphische Darstellung möglicher Potentialverläufe durch die Wechselwirkung zwischen kolloidalen Partikeln.<sup>[16]</sup>

Abbildung 2 zeigt mögliche Potentialverläufe, die sich durch die Wechselwirkungen zwischen den Teilchen ergeben können. Die Graphen zeigen den Verlauf der freien Energie  $\Delta G$  in Abhängigkeit des Partikelabstandes  $H$ . Es werden jeweils die attraktiven Wechselwirkungen (i), die repulsiven Wechselwirkungen (ii) und die aus der

Summe von (i) und (ii) resultierende Wechselwirkung (iii) gezeigt. Sind die repulsiven Wechselwirkungen stark, so zeigt sich im Kurvenverlauf ein primäres Maximum, d. h. eine Energiebarriere, die die Partikel nicht überwinden können (Fall a). Eine solche Dispersion ist stabil. Wenn die repulsiven Wechselwirkungen schwächer werden, so verringert sich die Höhe des Maximums, so dass die Energiebarriere von den Teilchen überwunden werden kann. Die Partikel können sich weiter annähern und letztendlich zu größeren Aggregaten koagulieren (Fall b). Fall c stellt den Extremfall einer instabilen Dispersion dar. Die repulsiven Wechselwirkungen sind so schwach, dass keine Energiebarriere vorliegt und sich die Partikel auch ohne Aktivierungsenergie annähern können. Im Fall d fallen die Partikel bei Annäherung in ein sekundäres Minimum, das sich vor dem primären Maximum befindet. Die Partikel aggregieren zwar, die Flockung ist aber meist reversibel.

Auch stabile Dispersionen sind nicht unbegrenzt stabil. Durch äußere Einflüsse wie Temperatur oder Druck kann die Energiebarriere herabgesetzt werden oder den Partikeln genügend Energie zugeführt werden, um die Barriere zu überwinden. Auch die Löslichkeit der Partikel, die durch die Partikelgröße beeinflusst wird, spielt eine Rolle. Kleine Partikel lösen sich schneller auf als große, und die gelösten Ionen oder Moleküle lagern sich an die großen Partikel an, so dass diese wachsen. Der Prozess des Partikelwachstums wird als Alterung bezeichnet. Für die Alterungsgeschwindigkeit  $dm/dt$  gilt:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{qDc_0}{\delta} \left[ e^{\frac{\gamma_{sl}}{f(r_1)RT}} - e^{\frac{\gamma_{sl}}{f(r_2)RT}} \right] \quad (1)$$

mit

$D$  = Diffusionskoeffizient

$c_0$  = Löslichkeit der makroskopischen Phase

$\delta$  = Viskosität

$\gamma_{sl}$  = Grenzflächenspannung

$r_1, r_2$  = Radien der Kolloide

$T$  = Temperatur

Die Funktion des Partikelradius muss den zeitlichen Verlauf des Partikelradius darstellen. Ein kolloidales System altert also nicht, wenn alle Partikel über alle Zeiten gleich groß sind. Ein solches System wird als streng monodispers bezeichnet und existiert in dieser Form in der Praxis nicht. Sobald einige Partikel im System eine abweichende Größe haben, beginnen die Partikel zu altern.

Nanopartikel können auch durch die Adsorption von Makromolekülen, Tensiden oder Polymeren, stabilisiert werden. Hierbei wird von sterischer Stabilisierung gesprochen; die adsorbierten Moleküle wirken wie eine Barriere und verhindern eine Annäherung der Nanopartikel.

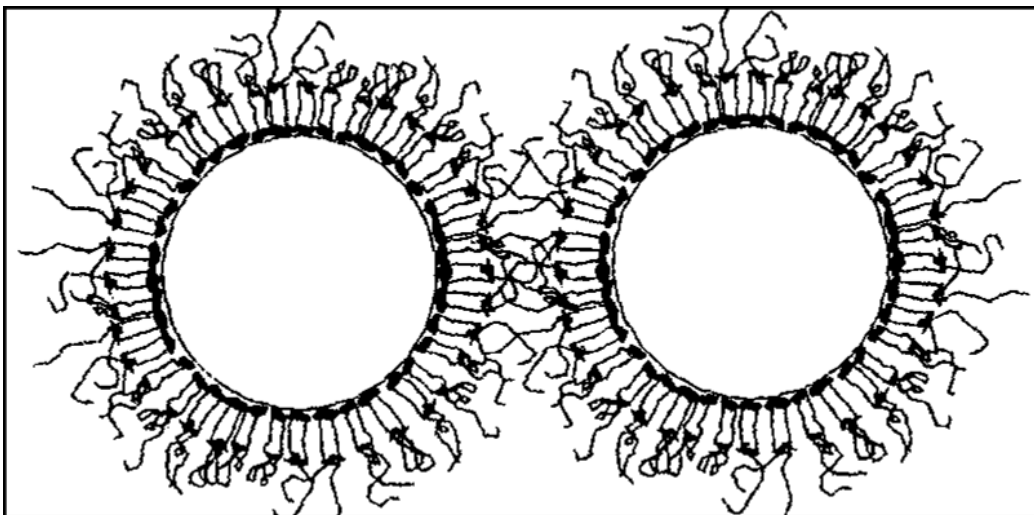


Abbildung 3: Schematische Darstellung der sterischen Stabilisierung durch Polymeradsorption.<sup>[16]</sup>

Wenn sich die Partikel soweit annähern, dass sich die adsorbierten Polymerschichten durchdringen, so wirken verschiedene Effekte, die eine weitere Annäherung verhindern. Die Polymere sind nicht vollständig an der Partikeloberfläche adsorbiert, ein Teil ragt in das Dispersionsmedium und kann sich frei bewegen. Bei der Annäherung der Partikel überlagern sich diese Polymerreste und die Beweglichkeit wird eingeschränkt. Dadurch wird die Entropie des Systems verringert. Dieser Zustand ist energetisch ungünstig, so dass sich die Partikel wieder voneinander entfernen. Zudem wird bei Annäherung der Partikel auch das Dispersionsmedium, das sich zwischen den Partikeln befindet, verdrängt. Im Zwischenraum entsteht ein osmotischer Druck, das Dispersionsmedium strömt zwischen die Partikel und drückt diese auseinander. Werden Polymere mit ionischen Gruppen, Polyelektrolyte, an der Partikeloberfläche adsorbiert, so werden die Partikel sowohl sterisch als auch elektrostatisch stabilisiert. Man spricht von einer elektrosterischen Stabilisierung.

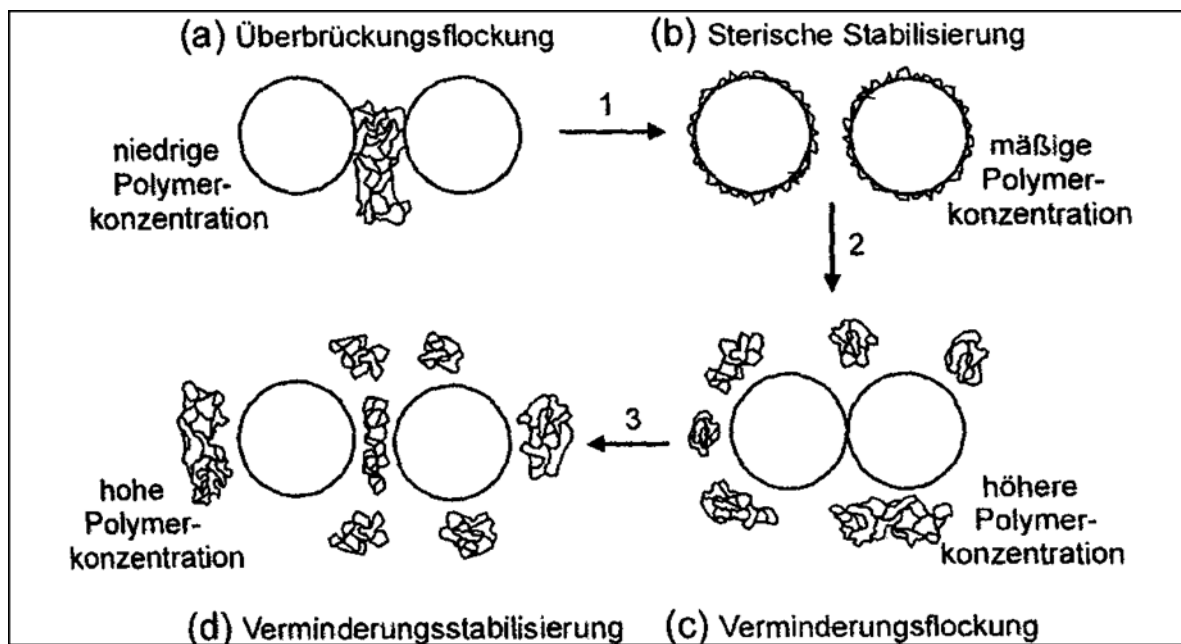


Abbildung 4: Abhängigkeit der Stabilität von Nanopartikel von der Polymerkonzentration.<sup>[16]</sup>

Eine Stabilisierung der Nanopartikel tritt allerdings nur in einem bestimmten Kon-

zentrationbereich auf. Zu viel oder zu wenig Polymer begünstigen eine Flockung der Partikel. So führt eine niedrige Polymerkonzentration dazu, dass mehrere Partikel über die Makromoleküle verbunden werden und sich größere Aggregate bilden. Bei höherer Polymerkonzentration können eine Verminderungsflockung oder eine Verminderungsstabilisierung auftreten.

### 3. Methoden

#### 3.1. Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM, engl. *scanning electron microscopy*, SEM) wird die zu untersuchende Probe mit einem gebündelten Elektronenstrahl abgerastert. Um Wechselwirkungen des Elektronenstrahls mit Molekülen aus der Luft zu vermeiden, wird die Probe im Hochvakuum untersucht. Die Elektronen werden in einer Glühkathode erzeugt und in einem elektrischen Feld (5-30 kV) beschleunigt. Anschließend wird der Elektronenstrahl mit Hilfe von Magnetspulen fokussiert. Trifft der Elektronenstrahl auf die Probe, so werden die Elektronen teilweise zurückgestreut. Diese elastisch gestreuten Elektronen werden als Primärelektronen bezeichnet. Der Elektronenstrahl kann auch Elektronen aus der Probe herausschlagen. Diese Elektronen haben eine niedrigere Energie als die eingestrahlten Elektronen und werden als Sekundärelektronen bezeichnet. Durch die Detektion der Primär- und Sekundärelektronen wird ein Bild der Probe berechnet. Der Nachteil ist, dass nur die Oberfläche der Probe dargestellt werden kann. Man erhält keine Informationen über die Morphologie im Innern der Probe. Außerdem können sich nichtleitende Proben aufladen. Dies lenkt den Elektronenstrahl ab und führt zu Fehlern bei der Abbildung. Solche Proben müssen mit einer dünnen Schicht eines metallischen Leiters (z. B. Au, Pd) besputtert werden.

Durch den Elektronenstrahl werden aber auch Elektronen aus den inneren Schalen der Atome herausgeschlagen. Die so entstandenen Lücken werden durch Elektronen höherer Schalen wieder aufgefüllt, dabei wird Röntgenstrahlung emittiert. Diese Röntgenstrahlung ist charakteristisch für die einzelnen Elemente. Dies macht man sich bei der Energiedispersiven Röntgenspektroskopie (engl. *energy dispersive x-ray spectroscopy*, EDX) zu Nutze. Es wird ein Röntgenspektrum der Probe aufgenommen. Die einzelnen Peaks können den Elementen, die in der Probe vorhanden sind, zugeordnet werden. Die Intensität der Peaks ist näherungsweise proportional zur ent-

haltenen Menge des Elements in der Probe.<sup>[17]</sup>

Die in dieser Arbeit dargestellten Proben wurden mit einem FEI Quanta FEG 400 untersucht. Die EDX-Spektren wurden mit dem EDAX EDS-Analysensystem Genesis 4000 aufgenommen. Zur Vorbereitung der Proben wurden diese auf einen Si-Wafer aufgetragen. Anschließend wurden sie mit einer Au/Pd-Legierung besputtert.

#### **3.2. Transmissionselektronenmikroskopie**

Das Prinzip der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ähnelt dem der Rasterelektronenmikroskopie. Elektronen werden thermisch emittiert und über eine angelegte Spannung beschleunigt. Die Spannungen im TEM liegen typischerweise bei 50-200 kV und damit deutlich über den im REM verwendeten Spannungen. Der fokussierte Elektronenstrahl trifft auf die Probe und durchstrahlt diese, wobei er teilweise abgelenkt wird. Die Elektronendichte in der Probe bestimmt den Grad der Ablenkung. Die gestreuten Elektronen werden über ein Objektiv gesammelt und ein Zwischenbild entsteht, welches weiter vergrößert auf einen Leuchtschirm projiziert wird. Der Nachteil beim TEM ist, dass die Proben sehr dünn sein müssen, damit diese vom Elektronenstrahl durchdrungen werden können; zudem ist das TEM aufgrund der hohen Elektronenenergie nicht für alle Proben geeignet. Zur Probenpräparation kann man die Probe in ein Harz einbetten, das anschließend in dünne Scheiben geschnitten wird, die man im TEM betrachten kann. Die Probe kann aber auch in geringer Konzentration auf ein Kupfergitter gegeben werden, welches mit einem dünnen Kohlenstofffilm bedampft wurde. Das entstandene Bild kann bei älteren Geräten abfotografiert werden, bei modernen Geräten kann es mit einer CCD-Kamera aufgenommen werden.

Die in dieser Arbeit dargestellten Proben wurden auf ein Kupfergitter gegeben und mit einem JEOL 1200 EX untersucht. Die EDX-Spektren wurden mit einem Oxford Instrument x-ray analysis ISIS 300 aufgenommen.

### 3.3. Dynamische Lichtstreuung

#### 3.3.1. Bestimmung der Teilchengröße

Mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) können die Größe von kolloidalen Teilchen und die Dispersität des Systems bestimmt werden. Durch die Brown'sche Bewegung bewegen sich die Partikel im Lösungsmittel zufällig. Wird die Probe mit geeignetem Licht bestrahlt, so wird dieses an den Partikeln in alle Richtungen gestreut. Bestrahlt man die Partikel eine kurze Zeit (wenige ms) später noch mal, so haben sich diese bewegt. Durch die Bewegung der Partikel ergibt sich eine konstruktive oder destruktive Interferenz des gestreuten Lichts. Dies führt zu zeitabhängigen Fluktuationen der Streuintensität. Die zeitliche Korrelation der Intensität des Streulichts wird durch eine Korrelationsfunktion beschrieben, die im Falle monodisperser Kugeln vom Translationsdiffusionskoeffizienten abhängt. Über die Stokes-Einstein-Gleichung lässt sich dann der hydrodynamische Radius der Teilchen bestimmen.

$$r_H = \frac{k T}{6 \pi \eta D} \quad (2)$$

mit

$r_H$  = hydrodynamischer Radius

$k$  = Boltzmann - Konstante

$T$  = Temperatur

$\eta$  = Viskosität des Lösungsmittels

$D$  = Diffusionskoeffizient

Die Korrelationsfunktion monodisperser Partikel zeigt einen exponentiellen Verlauf. Bei polydispersen Partikeln weicht der Verlauf der Korrelationsfunktion von dem der monodispersen Partikel ab. Die Auswertung der Messungen erfolgt deswegen nach der sogenannten Kumulantenmethode. Dabei nähert man sich durch eine Reihenent-



wicklung dem gefundenen Verlauf der Funktion an. Aus diesem sogenannten Kumulanten-Fit lässt sich der Polydispersitätsindex (PDI) der Dispersion berechnen. Dieser stellt ein Maß für die Breite der Größenverteilung der Partikel dar. Ein PDI von 0 entspricht einer streng monodispersen Größenverteilung. Dies ist in der Praxis aber kaum zu erreichen. Bis zu einem PDI von 0,3 spricht man noch von einer monodispersen Größenverteilung. Ab einem PDI oberhalb 0,5 ist die Dispersion als polydispers anzusehen.

Die Charakterisierung der Partikel über die Dynamische Lichtstreuung wurde mit einem Malvern Zetasizer Nano ZS (Laserwellenlänge 633 nm) durchgeführt.

#### 3.3.2. Zetapotential

Das Zetapotential ist eine wichtige Größe für die elektrostatische Stabilität von Kolloiden. Es lässt sich über die elektrophoretische Mobilität der Partikel berechnen. Durch die Ladung an der Oberfläche der Partikel wandern diese in einem angelegten Feld entsprechend ihrer Ladung zur Elektrode der Gegenladung. Die elektrophoretische Mobilität hängt mit der Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel und der elektrischen Feldstärke zusammen.

$$U_E = \frac{v}{E} \quad (3)$$

mit

$U_E$  = Elektrophoretische Mobilität

$v$  = Wanderungsgeschwindigkeit

$E$  = Elektrische Feldstärke

Über die Henry-Gleichung lässt sich aus der elektrophoretischen Mobilität das Zeta-potential berechnen.

$$\zeta = \frac{3U_E \eta}{2 \epsilon f(\kappa \alpha)} \quad (4)$$

mit

$\zeta$ =Zetapotential

$U_E$ =Elektrophoretische Mobilität

$\eta$ =Viskosität

$\epsilon$ =Dielektrizitätskonstante

$f(\kappa \alpha)$ =Henry-Funktion in Abhängigkeit von der Debyelänge  $\kappa$   
und dem Partikelradius  $\alpha$

Im Falle einer wässrigen Lösung mit geringer Elektrolytkonzentration wird nach der Smoluchowski-Näherung für die Henry-Funktion der Wert 1,5 eingesetzt.<sup>[18]</sup> Die Bestimmung des Zetapotentials wurde ebenfalls mit dem Malvern Zetasizer Nano ZS (Laserwellenlänge 633 nm) durchgeführt.

#### 3.4. Scheibenzentrifuge

Die Scheibenzentrifuge dient zur Größenbestimmung kolloidaler Teilchen. Dabei wird die Abhängigkeit der Sedimentationsgeschwindigkeit von der Teilchengröße und der Dichte der Teilchen genutzt. Die Sedimentationsgeschwindigkeit wächst mit dem Quadrat der Korngröße, so dass auch kleine Größenunterschiede detektiert werden können. Die Scheibenzentrifuge besteht im Prinzip aus einer rotierenden Scheibe, auf die die Partikeldispersion aufgetragen wird. Zuvor wird mit Hilfe von Zuckerlösungen ein Dichtegradient auf der Scheibe eingestellt. Die Partikel werden in die Mitte der Scheibe gegeben, so dass sie durch die Rotation der Scheibe nach außen getragen

werden. Am äußeren Rand befindet sich eine Lichtquelle und ein Detektor, die die Absorption der Teilchen detektieren. Da sich große Partikel schneller zum Rand der Scheibe bewegen als kleine, kann aus der Zeit, die die Partikel benötigen, mit Hilfe des Stoke'schen Gesetzes die Partikelgröße berechnet werden. Der Nachteil dieser Methode ist die geringe Sedimentationsgeschwindigkeit von kleinen Partikeln sowie von Partikeln mit geringer Dichte.

Die in dieser Arbeit dargestellten Proben wurden mit einer CPS Instruments DC24000 Scheibenzentrifuge mit einer 470 nm Lichtquelle vermessen.

#### 3.5. Röntgenbeugung

Die Röntgenbeugung (engl. *x-ray diffraction*, XRD) ist eine häufig angewandte Methode, um unbekannte kristalline Verbindungen zu charakterisieren.

Die Wellenlänge der Röntgenstrahlung liegt in der Größenordnung der interatomaren Abstände in einem Kristall, so dass die Strahlung an den Netzebenenscharen des Kristalls gebeugt wird. Die an einer Netzebenenschar gebeugten Strahlen zeigen nur konstruktive Interferenz, wenn der Gangunterschied zwischen den Strahlen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist. Dieser Gangunterschied kann aus dem Einfallswinkel  $\Theta$  und dem Netzebenenabstand  $d_{hkl}$  mit Hilfe der Bragg'schen Beziehung berechnet werden.

$$n \lambda = 2d_{hkl} \sin \Theta \quad (5)$$

mit

$n$  = Beugungsordnung

$\lambda$  = Wellenlänge der Röntgenstrahlung

$d_{hkl}$  = Abstand der Netzebenen

$\Theta$  = Bragg- oder Glanzwinkel

Die Bragg'sche Bedingung ist für eine Netzebenenschar nur für einen bestimmten Winkel, den Bragg- oder Glanzwinkel, erfüllt.

Für die Aufnahme von Diffraktogrammen wird häufig das Bragg-Brentano-Verfahren verwendet. Dabei werden die in einem Winkel von  $2\Theta$  zum einfallenden Strahl gebeugten Strahlen über einen beweglichen Detektor aufgenommen. Dieser kann ein Proportional-, Szintillations- oder Geiger-Müller-Zähler sein, der mit einer Zähl Elektronik verbunden ist. Jede kristalline Phase hat ein charakteristisches Beugungsmuster, so dass das Diffraktogramm einer Probe durch einen Vergleich mit der ICDD- (*International Centre for Diffraction Data*) Datenbank identifiziert werden kann. Dabei sind das Beugungsmuster und die relativen Intensitäten der Peaks von Bedeutung. Auch der Grad der Kristallinität lässt sich über die Röntgenbeugung bestimmen. Bei hochkristallinen Proben werden schmale Peaks erhalten, bei amorphem Material sind aufgrund der fehlenden Fernordnung keine Peaks zu erkennen. Bei nanokristallinen Proben sind die Peaks aufgrund der begrenzten Dimensionen der Kristalle verbreitert. Die Pulverdiffraktogramme wurden mit einem D 8 Advance Diffraktometer der Firma Bruker aufgenommen. Zur Aufnahme wurde Kupfer- $K\alpha$ -Strahlung mit einer Wellenlänge von  $1,54060 \text{ \AA}$  verwendet.

#### 3.6. Fluoreszenzspektroskopie

Ein Fluoreszenzspektrometer besteht aus zwei Strahlengängen, dem Anregungs- und dem Emissionsstrahlengang. Aus dem von der Lampe ausgestrahlten polychromatischen Licht wird durch das Anregungsgitter monochromatische Strahlung erzeugt. Ein Teil dieser Strahlung wird zu einem Quantenzähler geleitet, der dazu dient, Intensitätsschwankungen der Lampe zu kompensieren. Da die emittierte Strahlung diffus und isotrop ist, befindet sich die Probe relativ nahe am Eingangsspalt des Emissionsstrahlenganges. Hierdurch lässt sich der Verlauf der Strahlung besser kontrollieren. Der Emissionsmonochromator dient dazu, die Wellenlängenauflösung so zu begren-

zen, dass möglichst viel Energie erfasst wird, die Wellenlängenauflösung aber noch eng genug ist, um keine Informationen zu verlieren.

Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem FL3095-500 Fluorometer der Firma J&M Analytische Mess- und Regeltechnik GmbH mit einer Xenonlampe (75 W) als Lichtquelle sowie mit einem Varian Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer mit einer Xenon-Blitzlampe als Lichtquelle aufgenommen. Für die Messungen von festen Proben wurden jeweils 10 mg abgewogen. Die Fluoreszenz von flüssigen Proben wurde bei einer Partikelkonzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  in Quarzküvetten (1 cm Schichtdicke) gemessen.

#### **3.7. Thermogravimetrie**

Die Thermogravimetrie ist eine thermoanalytische Methode, bei der die Masseänderung einer Probe in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit gemessen wird. Die Probe befindet sich in einem Tiegel aus inertem Material ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , Platin) in einer definierten Atmosphäre, die inert ( $\text{N}_2$ , Ar), oxidierend ( $\text{O}_2$ ) oder reduzierend ( $\text{H}_2$ /Luft) sein kann. Der Tiegel ist an eine Mikrowaage gekoppelt, mit der die Masseverluste während des Aufheizvorgangs gemessen werden. Durch eine Kopplung an ein Infrarot (IR)-Spektrometer oder ein Massenspektrometer können die bei der Zersetzung der Probe entstehenden Gase sofort analysiert werden. Über den Verlauf des Massenverlustes und die Analyse der entstandenen Gase lässt sich die Zusammensetzung der Probe bestimmen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Proben wurden mit einem STA 409 PC der Firma Netzsch untersucht. Die Messungen wurden in  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Tiegeln in einer  $\text{O}_2$ -Atmosphäre ( $50 \text{ mL min}^{-1}$ ) mit einer Heizrate von  $1 \text{ K min}^{-1}$  durchgeführt.

#### **3.8. UV/Vis-Spektroskopie**

Mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie können Absorptionsspektren von Substanzen im

sichtbaren bis ultravioletten Bereich des Lichts aufgenommen werden. Die Methode beruht darauf, dass Substanzen durch Absorption von Licht bestimmter Wellenlänge elektronisch angeregt werden. Die UV/Vis-Spektroskopie eignet sich dazu, funktionelle Gruppen an meist organischen Molekülen qualitativ zu bestimmen. Für eine quantitative Analyse von Substanzen muss diese zuerst in unterschiedlichen Konzentrationen vermessen werden, so dass man eine Kalibrationsgerade erhält. Über diese ist es anschließend möglich, die Konzentration der Substanz zu quantifizieren. Die in dieser Arbeit dargestellten Proben wurden mit einem Varian Cary WinUV Spektrophotometer in Quarzküvetten (1 cm Schichtdicke) gemessen.

#### **3.9. Infrarotspektroskopie**

Die Infrarot (IR)-Spektroskopie dient zur qualitativen Analyse von Molekülen. Durch die Absorption von IR-Strahlung werden in einem Molekül Schwingungen von Molekülbindungen angeregt. Die von der Bindung absorbierte Energie ist charakteristisch für die jeweilige Bindung, so dass man mit Hilfe der IR-Spektroskopie Molekülstrukturen aufklären kann. Mit der IR-Spektroskopie können allerdings nicht alle Molekülschwingungen angeregt werden. Voraussetzung hierfür ist ein permanentes oder induziertes Dipolmoment, das sich während der Anregung ändert. IR-Spektren können entweder als Absorptions- oder als Transmissionsspektren dargestellt werden. Die in dieser Arbeit dargestellten Proben wurden mit einem PerkinElmer Spectrum One gemessen. Die Proben wurden in geringer Konzentration mit Kaliumbromid verrieben und anschließend gepresst.

#### **3.10. Atomabsorptionsspektroskopie**

Die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) dient zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Elementen. Jedes Element hat spezifische Absorptionslinien, so dass durch die Bestrahlung mit

Licht die Elemente nachgewiesen werden können. Über den Vergleich der Intensitäten des eingestrahnten Lichts und des durchgelassenen Lichts lassen sich Elemente quantitativ nachweisen. Bei der AAS müssen die zu untersuchenden Atome in der Gasphase vorliegen. Die Proben werden entweder durch Erhitzung in einer Flamme (Flammen-AAS) oder in einem Graphitofen in die Gasphase gebracht. Der Graphitofen ist dabei effizienter als die Flamme, es können geringere Probenmengen vermessen werden.<sup>[19]</sup>

Die AAS wurde mit einem M-Series AA Spektrometer der Firma Thermo Electron Corporation durchgeführt.

### 4. Ergebnisse und Diskussion

#### 4.1. Lanthanoid-dotierte Hydroxylapatit-Nanopartikel

Fluoreszierende Materialien spielen eine wichtige Rolle in den Biowissenschaften. Mit ihrer Hilfe können biologische Prozesse detektiert und so besser verstanden werden. Im medizinischen Bereich werden fluoreszierende Farbstoffe häufig in der Diagnostik eingesetzt.<sup>[20-22]</sup> Hier werden meist organische Farbstoffe verwendet, die eine hohe Quantenausbeute haben und sehr selektiv sind. Allerdings zersetzen sich die organischen Farbstoffe bei Bestrahlung oft schnell. Sie unterliegen der so genannten Photobleichung, die Langzeituntersuchungen mit solchen Farbstoffen manchmal unmöglich macht.<sup>[23, 24]</sup> Zusätzlich weisen organische Farbstoffe eine kleine Stokes-Verschiebung auf, d. h. der Unterschied zwischen dem Anregungslicht und dem emittierten Licht ist sehr gering. Durch eventuell auftretendes Streulicht kann so die Detektion der emittierten Strahlung erschwert werden.

Auch fluoreszierende anorganische Materialien können Verwendung in den Biowissenschaften finden, so z. B. Halbleiternanopartikel, so genannte Quantenpunkte. Die Wellenlänge der emittierten Strahlung lässt sich bei diesen Partikeln einfach über die Größe der Partikel einstellen.<sup>[25, 26]</sup> Allerdings bestehen Quantenpunkte aus giftigen Materialien wie z. B. CdSe,<sup>[27-31]</sup> wodurch die Anwendung in lebenden Systemen eingeschränkt wird. Zudem zeigen die Quantenpunkte bei Bestrahlung einen Mechanismus, bei dem die Fluoreszenz an- und ausgeschaltet wird, das so genannte optische Blinken.<sup>[11, 32]</sup>

Andere anorganische Materialien sind Lanthanoide, die in ein anorganisches Wirtsgitter dotiert werden können.<sup>[33]</sup> Von den Lanthanoiden sind die Elemente von Samarium bis Dysprosium interessant, da diese große Bandlücken haben und prinzipiell fluoreszieren können.<sup>[34]</sup> Allerdings ist die Fluoreszenz der freien Ionen sehr schwach, da sie auf Übergängen der f-Orbitale beruht, die nach dem Laporte-Verbot nicht erlaubt sind.<sup>[35, 36]</sup> Durch den Einbau der Lanthanoid-Ionen in geeignete Wirtsgitter kann



ein Energietransfer vom Wirtsgitter zu dem entsprechenden Lanthanoid-Ion stattfinden, der letztendlich die Fluoreszenz ermöglicht. Im Fall von dotierten Hydroxylapatit-Kristallen nehmen die Sauerstoffatome der Phosphatgruppen die Energie auf und transferieren sie zum Lanthanoid-Ion. Hierfür wird allerdings UV-Strahlung benötigt. Durch die Dotierung der Lanthanoide auf einen kristallographischen Platz ohne Inversionssymmetrie kann ein kleiner Beitrag einer Wellenfunktion entgegengesetzter Parität zu der 4f-Wellenfunktion gemischt werden. Hierdurch wird das Übergangsverbot gelockert, so dass die f-f-Übergänge stattfinden können.<sup>[35]</sup> Dabei unterliegen die Lanthanoid-dotierten Materialien nicht der Photobleichung, wodurch Langzeituntersuchungen ermöglicht werden. Zudem weist die Fluoreszenz der Lanthanoid-Ionen eine breite Stokes-Verschiebung auf, so wird die Detektion der Fluoreszenzstrahlung vereinfacht. Durch die Dotierung der Lanthanoid-Ionen in geeignete biokompatible Wirtsgitter kann die toxische Wirkung minimiert werden.

#### 4.1.1. Experimenteller Teil

Für die Synthese der Lanthanoid-dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikel werden zunächst zwei Lösungen hergestellt. Die erste Lösung hat die Gesamtionenkonzentration von 19,91 mM, die jeweiligen Stoffmengenanteile der verwendeten Lanthanoide und der daraus resultierende Stoffmengenanteil des Calciumnitrats sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Stoffmengenanteile der verwendeten Salze für Lösung 1

	Eu(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> /Y(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Tb(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> /Ce(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Dy(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> /Y(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
$\chi$ (Ca <sup>2+</sup> )	1-(x+y)	1-(x+y)	1-(x+y)
$\chi$ (Eu <sup>3+</sup> )	x = 0,02		
$\chi$ (Tb <sup>3+</sup> )		x = 0,02	
$\chi$ (Dy <sup>3+</sup> )			x = 0,02
$\chi$ (Y <sup>3+</sup> )	y = 0,001 bis 0,1		y = 0,001 bis 0,05
$\chi$ (Ce <sup>3+</sup> )		y = 0,001 bis 0,05	

---

Die zweite Lösung ist eine 11,94 mM *di*-Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung, deren pH-Wert mit wässrigem Ammoniak auf 10 eingestellt wird. Die Konzentrationen der beiden Lösungen wurden so gewählt, dass sich stöchiometrisch Hydroxylapatit bilden kann.

200 mL von Lösung 1 werden in einem 500 mL-Dreihalskolben mit Rückflusskühler auf 60 °C erhitzt. Ist die Temperatur erreicht, so werden 200 mL von Lösung 2 langsam zugetropft. Im Anschluss daran wird das Gemisch noch 5 Stunden bei 60 °C gerührt. Dabei fällt das Produkt aufgrund der langen Reaktionszeit quantitativ aus, so dass die Ausbeute 100 % beträgt. Nach Ablauf der Zeit wird der weiße Niederschlag bei 2540 g für 10 Minuten zentrifugiert, zweimal mit Wasser gewaschen und gefriergetrocknet. Anschließend werden 120 mg der Partikel abgewogen, jeweils 30 mg in 5 mL Wasser suspendiert ( $c = 6 \text{ mg mL}^{-1}$ ) und in Autoklaven ( $V = 20 \text{ mL}$ ) für 24 Stunden auf 200 °C erhitzt. Zur Funktionalisierung mit Polyethylenimin wird der Überstand abdekantiert, und die Partikel werden in 10 mL Wasser aufgenommen. Dann werden 10 mL einer Polyethylenimin (PEI)-Lösung mit der Konzentration  $2 \text{ g L}^{-1}$  ( $\text{pH} = 10$ ) zugegeben, anschließend werden die Partikel im Ultraschallbad redispersiert. Im Anschluss daran wird die Dispersion bei 2540 g für 60 Minuten zentrifugiert und zweimal mit Wasser gewaschen, dann werden die funktionalisierten Partikel gefriergetrocknet.

### 4.1.2. Hydroxylapatit-Nanopartikel, dotiert mit Europium

Europium-dotierte Materialien emittieren Licht im roten Bereich des sichtbaren Spektrums. Die elektronischen Übergänge führen aus dem  $^5\text{D}_0$ -Niveau in  $^7\text{F}_J$ -Niveaus ( $J = 0, 1, 2, 3, 4$ ). Der intensivste Übergang ist der  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ -Übergang, der im Bereich von 610-630 nm emittiert. Darauf folgen der  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ -Übergang zwischen 585 und 600 nm und der  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_4$ -Übergang bei 680-705 nm. Die übrigen Übergänge sind meist nur sehr schwach.<sup>[37]</sup>  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen haben einen Ionenradius von 112 pm, und

$\text{Ca}^{2+}$ -Ionen haben einen Ionenradius von 99 pm. Der Unterschied in den Ionenradien ist gering, so dass die  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Kristallgitter des Hydroxylapatits substituieren können. Dadurch bietet sich die Möglichkeit, durch die Dotierung von Hydroxylapatit-Nanopartikeln mit Europium-Ionen fluoreszierende, biokompatible Nanopartikel zu synthetisieren.<sup>[38-40]</sup> Aufgrund des Ladungsunterschieds der Ionen müssen für zwei  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen drei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Gitter entfernt werden, damit die elektrische Neutralität erhalten bleibt. Vergleicht man die Emissionsspektren von mikrokristallinen und nanokristallinen Hydroxylapatit-Partikeln, jeweils dotiert mit 2 mol-% Europium, so fällt auf, dass die Intensität der emittierten Strahlung bei Nanopartikeln deutlich geringer ist als bei mikrokristallinen Partikeln.

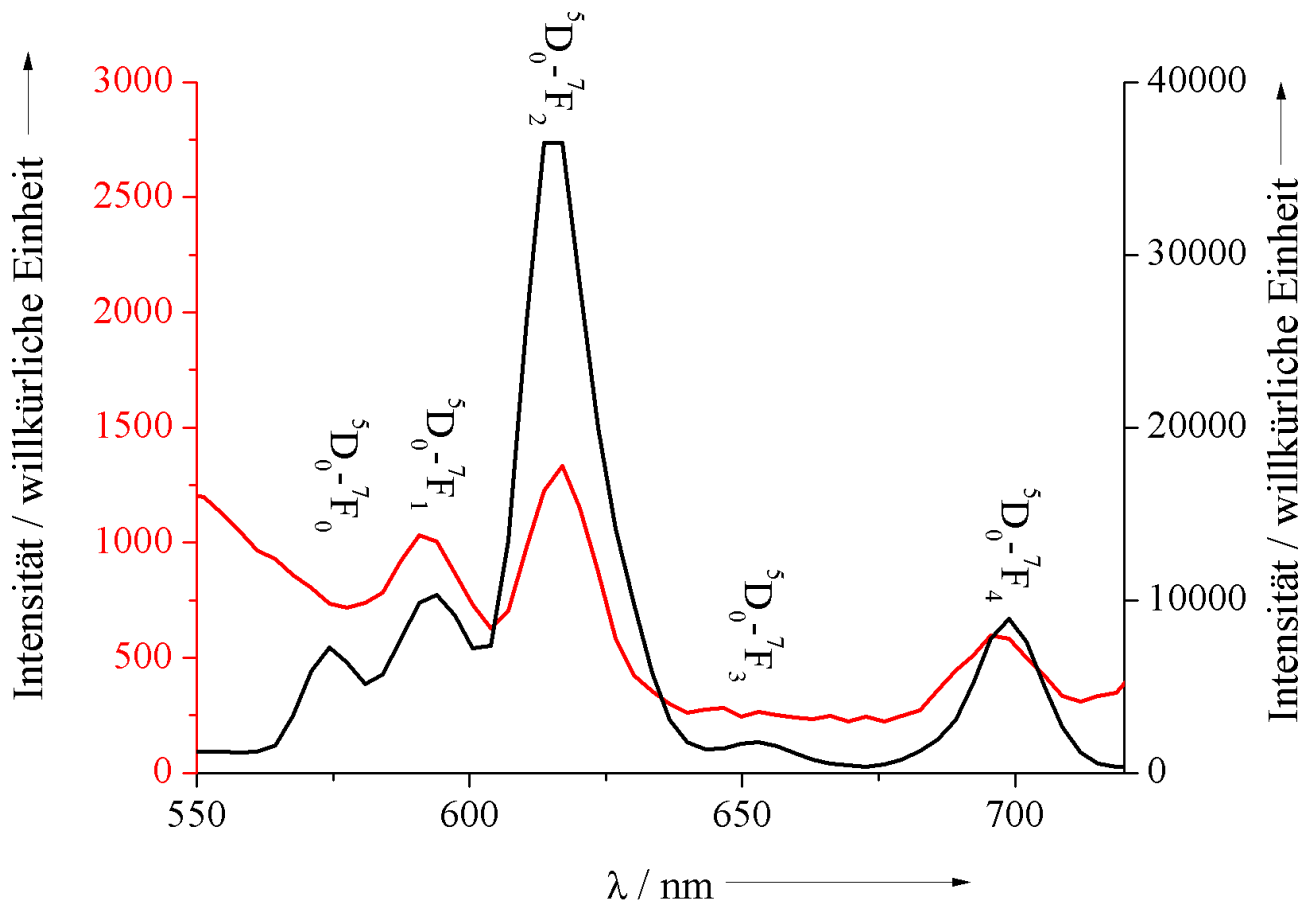


Abbildung 5: Vergleich der Emissionsspektren von nanokristallinen (rote Kurve) und mikrokristallinen (schwarze Kurve) Hydroxylapatit-Partikeln, jeweils dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen, gemessen als Feststoff.

Abbildung 5 zeigt den Unterschied der Fluoreszenzintensität von Europium-dotierten mikro- und nanokristallinen Partikeln. Die mikrokristallinen Partikel wurden aus den nanokristallinen Partikeln hergestellt, indem diese für 4 h auf 1100 °C erhitzt wurden. Die Fluoreszenzintensität der Nanopartikel ist deutlich geringer als die Intensität des mikrokristallinen Hydroxylapatits. Eine Ursache für die geringere Fluoreszenzintensität ist die geringe Kristallinität der Nanopartikel.

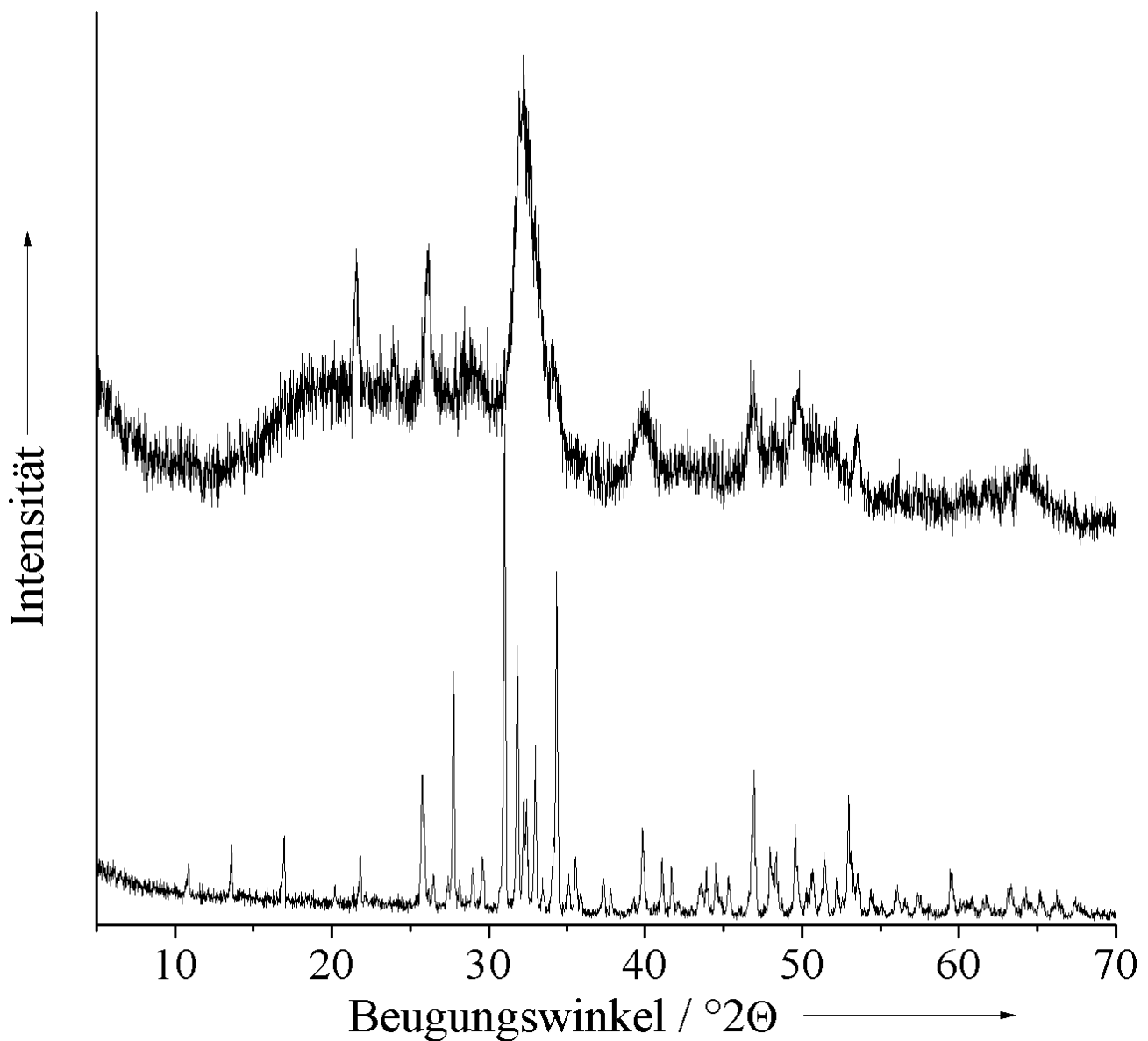


Abbildung 6: Vergleich der Kristallinität von mikrokristallinen (untere Kurve) und nanokristallinen (obere Kurve) Hydroxylapatit-Partikeln, jeweils dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen.

Die Diffraktogramme in Abbildung 6 zeigen die unterschiedliche Kristallinität von Mikro- und Nanopartikeln. Im unteren Diffraktogramm sind scharfe, schmale Reflexe zu erkennen, die auf eine hohe Kristallinität der Mikropartikel hindeuten. Im oberen Diffraktogramm sind deutlich verbreiterte Reflexe zu erkennen, die eine geringere

Kristallinität belegen. Aufgrund der geringeren Kristallinität der Nanopartikel ist der Energietransfer des Gitters auf die Europium-Ionen nicht so effizient, so dass nanokristalline Proben eine geringere Fluoreszenzintensität aufweisen. Der Grund hierfür ist in der großen spezifischen Oberfläche von Nanopartikeln zu suchen. Dotiert man Nanopartikel mit Fremdionen, so befinden sich auch viele dieser Fremdionen an der Oberfläche der Partikel. Im Fall der Lanthanoide unterliegen diese Oberflächenionen äußeren Einflüssen, die Fluoreszenz kann durch das umgebende Medium effektiv gelöscht werden ("quenching"). Außerdem können die Lanthanoid-Ionen an der Oberfläche der Partikel nicht so gut über einen Energietransfer des Wirtsgitters angeregt werden.

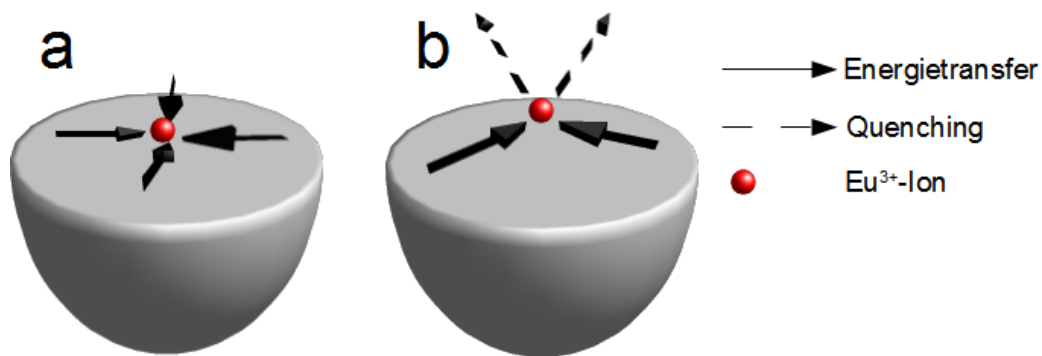


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Energietransfers vom Gitter zu Volumenatomen (a) und zu Oberflächenatomen (b) in einem sphärischen Partikel.

Um die Emissionsintensität zu erhöhen, können die dotierten Nanopartikel mit einem geeigneten Sensibilisator co-dotiert werden. Der Sensibilisator nimmt die zugeführte Energie auf und transferiert sie auf den Aktivator, der die Energie dann wieder als Strahlung emittiert. Für Europium-dotierte Partikel eignet sich Yttrium als Sensibilisator.<sup>[41]</sup> Allerdings muss der Sensibilisator im richtigen Verhältnis zum Aktivator stehen. Bei zu geringer Konzentration findet kein effektiver Energietransfer statt, bei zu hoher Konzentration wird die Fluoreszenzintensität durch das so genannte Konzentra-

tions-Quenching wieder schwächer.<sup>[41]</sup>

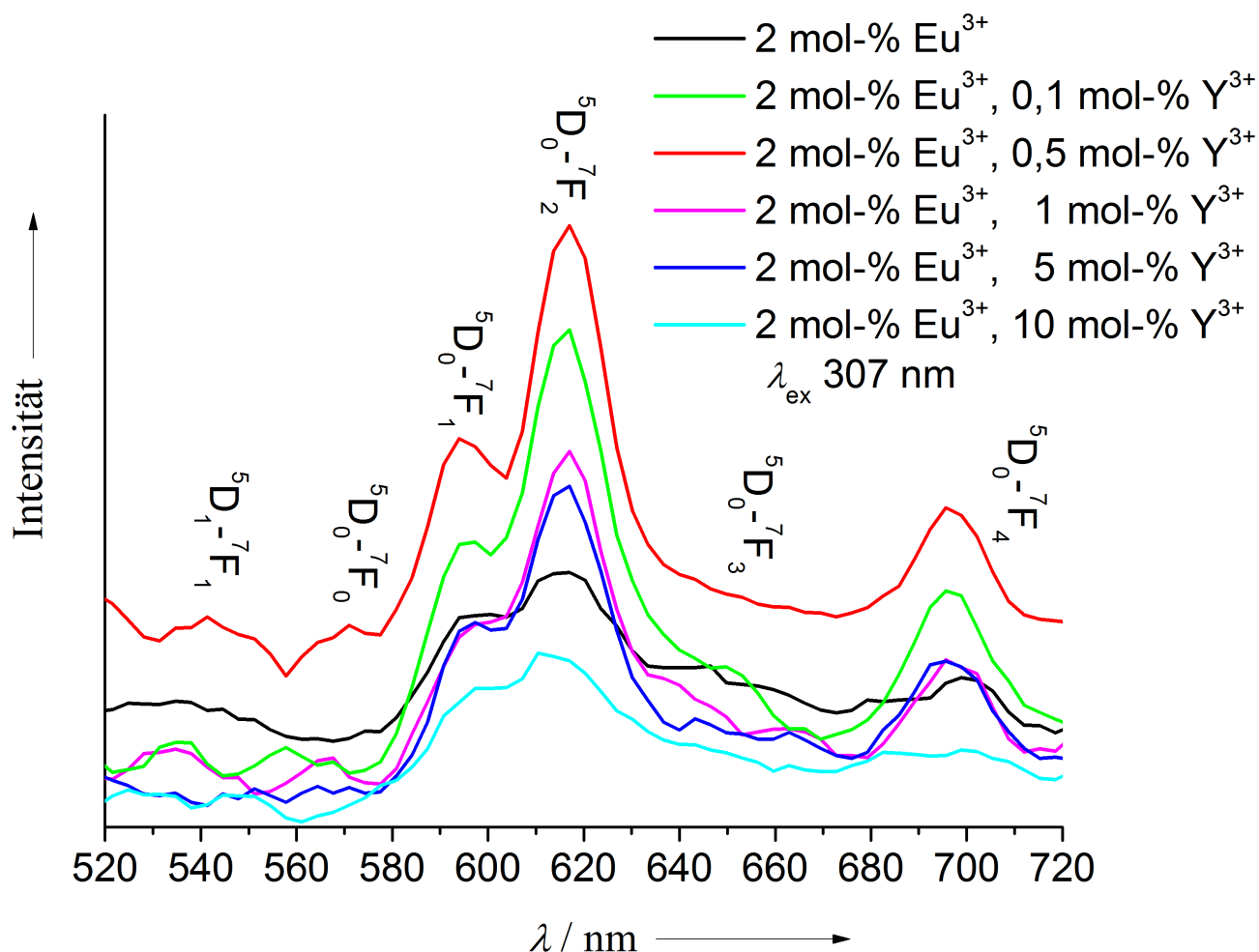


Abbildung 8: Fluoreszenzspektren von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, dotiert 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und co-dotiert mit unterschiedlichen Mengen an  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen, gemessen als Feststoff.

In Abbildung 8 sind Fluoreszenzspektren von  $\text{Eu}^{3+}$ - und  $\text{Y}^{3+}$ -co-dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikeln zu sehen. Schon bei geringen Mengen an zudotierten  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen steigt die Fluoreszenzintensität an. Das Maximum ist bei einer Menge von 0,5 mol-% co-dotierten  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen erreicht, hier ist die Fluoreszenzintensität fast dreimal höher, verglichen mit den ausschließlich mit  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikeln. Werden mehr  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen zugegeben, so sinkt die Fluoreszenzintensität wieder,

bis sie bei einer Menge von 10 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen sogar unter die Fluoreszenzintensität des Ausgangsmaterials gesunken ist. Ab einer Konzentration von 1 mol-% sind bereits zu viele  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen im Kristallgitter eingebaut, so dass der Energietransfer gestört wird.

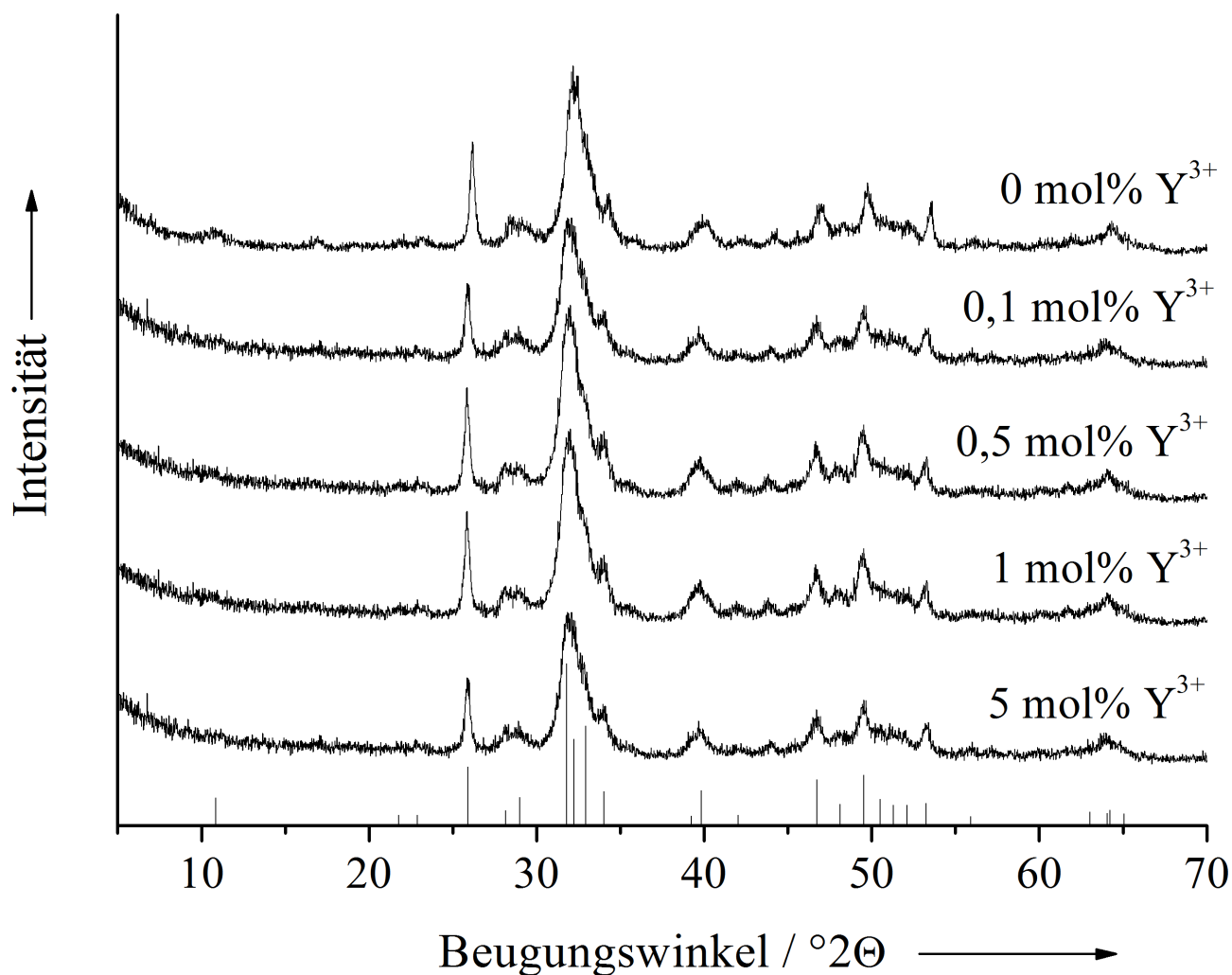


Abbildung 9: Diffraktogramme von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und co-dotiert mit verschiedenen Mengen an  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen (Referenz: Hydroxylapatit, JCDPS #76-0694).

In den Diffraktogrammen in Abbildung 9 lässt sich erkennen, dass bei allen Proben Hydroxylapatit die einzige Modifikation ist. Selbst große Mengen an zudotiertem



Yttrium haben keinen Einfluss auf die Kristallstruktur. Außerdem lässt sich daraus schließen, dass das eingebaute Yttrium ausschließlich an den Calciumpositionen eingebaut wurde und sich kein Yttriumphosphat gebildet hat. Auch in REM-Aufnahmen zeigen sich keine morphologischen Unterschiede zwischen ausschließlich mit Europium dotierten und mit Europium und Yttrium co-dotierten Partikeln.

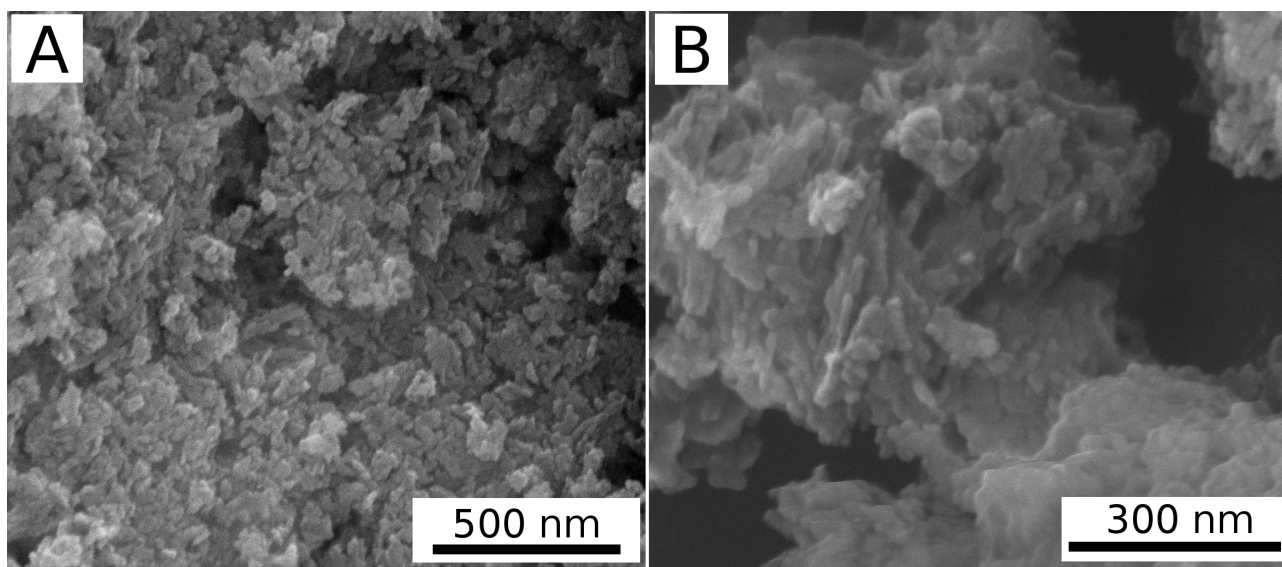


Abbildung 10: REM-Aufnahmen von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen (A) und dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ - und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen.

Die REM-Aufnahmen in Abbildung 10 zeigen stäbchenförmige Partikel. Die Partikel sind allerdings stark aggregiert, die Länge der Stäbchen liegt bei ca. 100 nm, die Breite der Stäbchen lässt sich aufgrund der Aggregation nicht bestimmen.

Eine weitere Erhöhung der Fluoreszenzintensität lässt sich über die Erhöhung der Kristallinität erreichen, da kristalline Materialien weniger Fehler im Gitter aufweisen und einen besseren Energietransfer auf die Aktivator- und Sensibilisator-Ionen ermöglichen. Die Erhöhung der Kristallinität sollte die Partikelgröße dabei aber nur geringfügig beeinflussen. Dies lässt sich über einen Hydrothermalprozess erreichen, bei dem die Kristallinität erhöht wird und zudem auch die spezifische Oberfläche der Partikel verringert wird, so dass äußere Quenchingeinflüsse ebenfalls verringert wer-

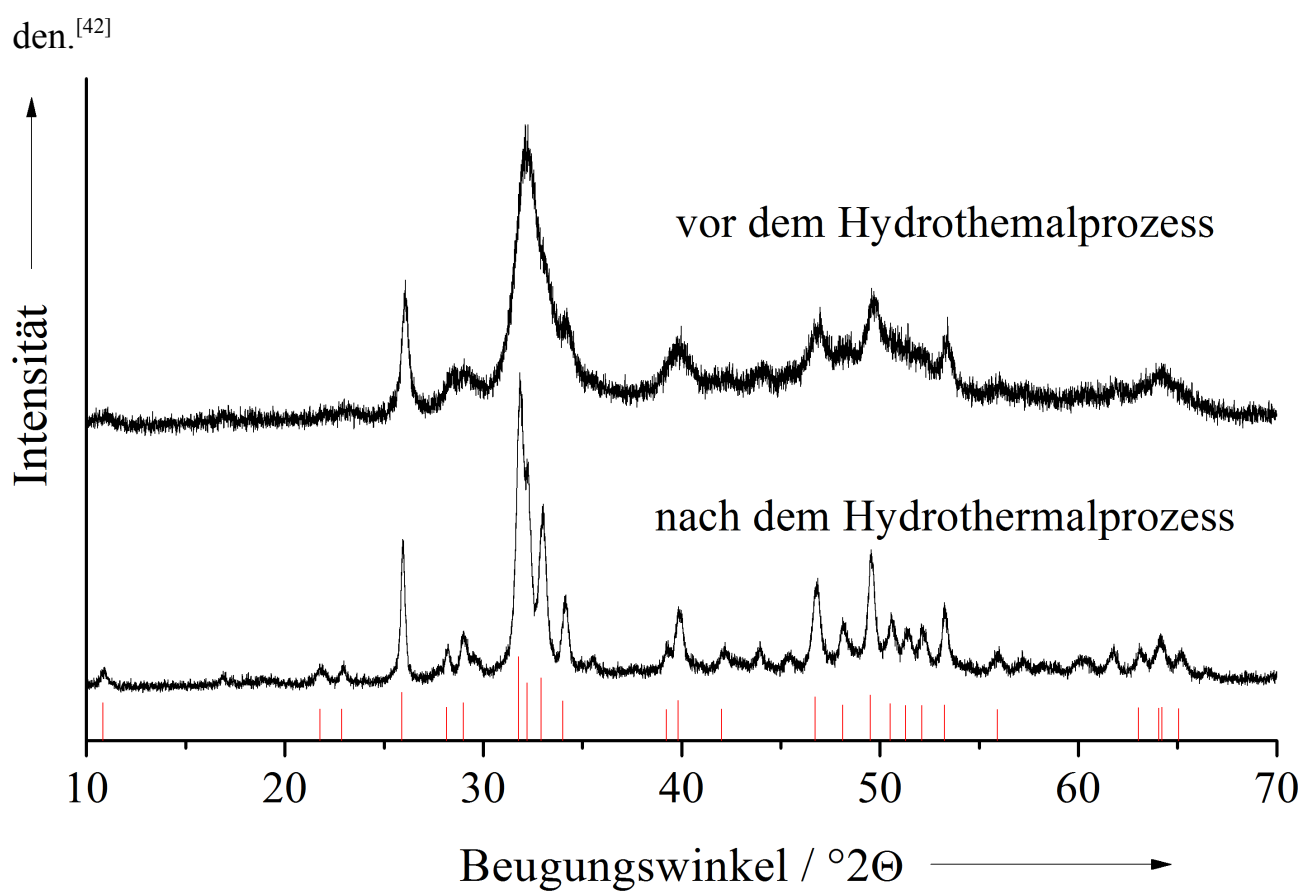


Abbildung 11: Diffraktogramme von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen vor dem Hydrothermalprozess (oben) und nach dem Hydrothermalprozess (unten) (Referenz: Hydroxylapatit, JCDPS #76-0694).

Der Vergleich der beiden Diffraktogramme in Abbildung 11 zeigt die unterschiedliche Kristallinität der Hydroxylapatit-Nanopartikel vor dem Hydrothermalprozess und nach dem Hydrothermalprozess. Die Kristallinität wurde durch den Hydrothermalprozess deutlich erhöht, die einzelnen Reflexe sind schmaler und deutlich voneinander zu unterscheiden.

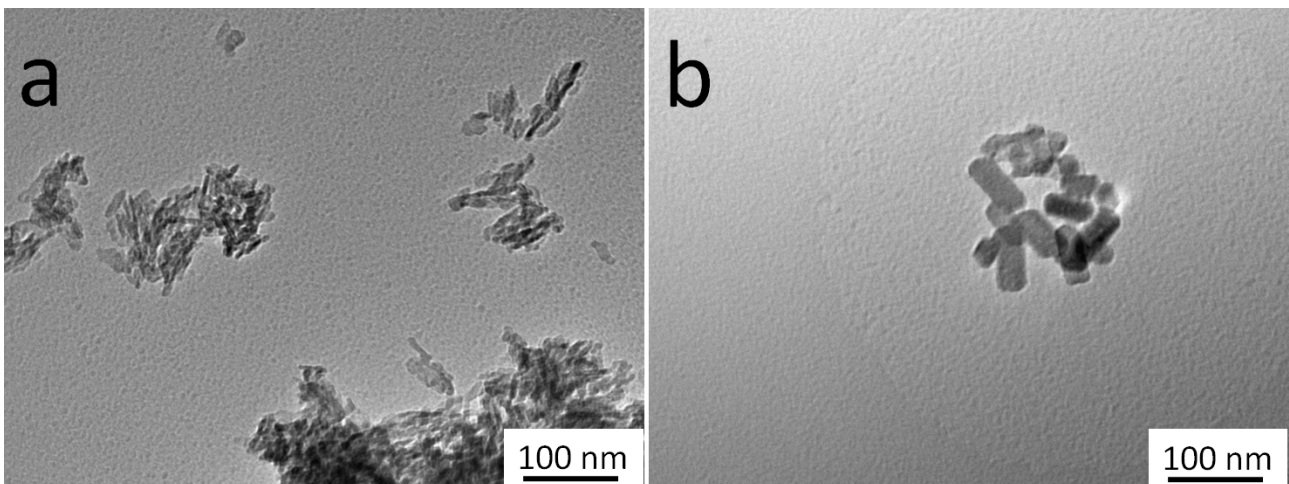


Abbildung 12: TEM-Aufnahme von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen, vor dem Hydrothermalprozess (a) und nach dem Hydrothermalprozess (b).

In den TEM-Aufnahmen in Abbildung 12 sieht man den Effekt des Hydrothermalprozesses auf die Morphologie der Hydroxylapatit-Nanopartikel. Vor dem Hydrothermalprozess sind diese stark aggregiert, so dass eine Bestimmung der Länge und der Breite erschwert wird. Die Stäbchen sind ungefähr 50-100 nm lang und nur wenige nm breit. Nach dem Hydrothermalprozess sind die Partikel besser voneinander zu unterscheiden. Die Partikel sind in der Breite gewachsen, diese beträgt jetzt etwa 30 nm. In der Länge haben sich die Stäbchen jedoch nicht verändert, sie sind weiterhin ca. 50-100 nm lang.

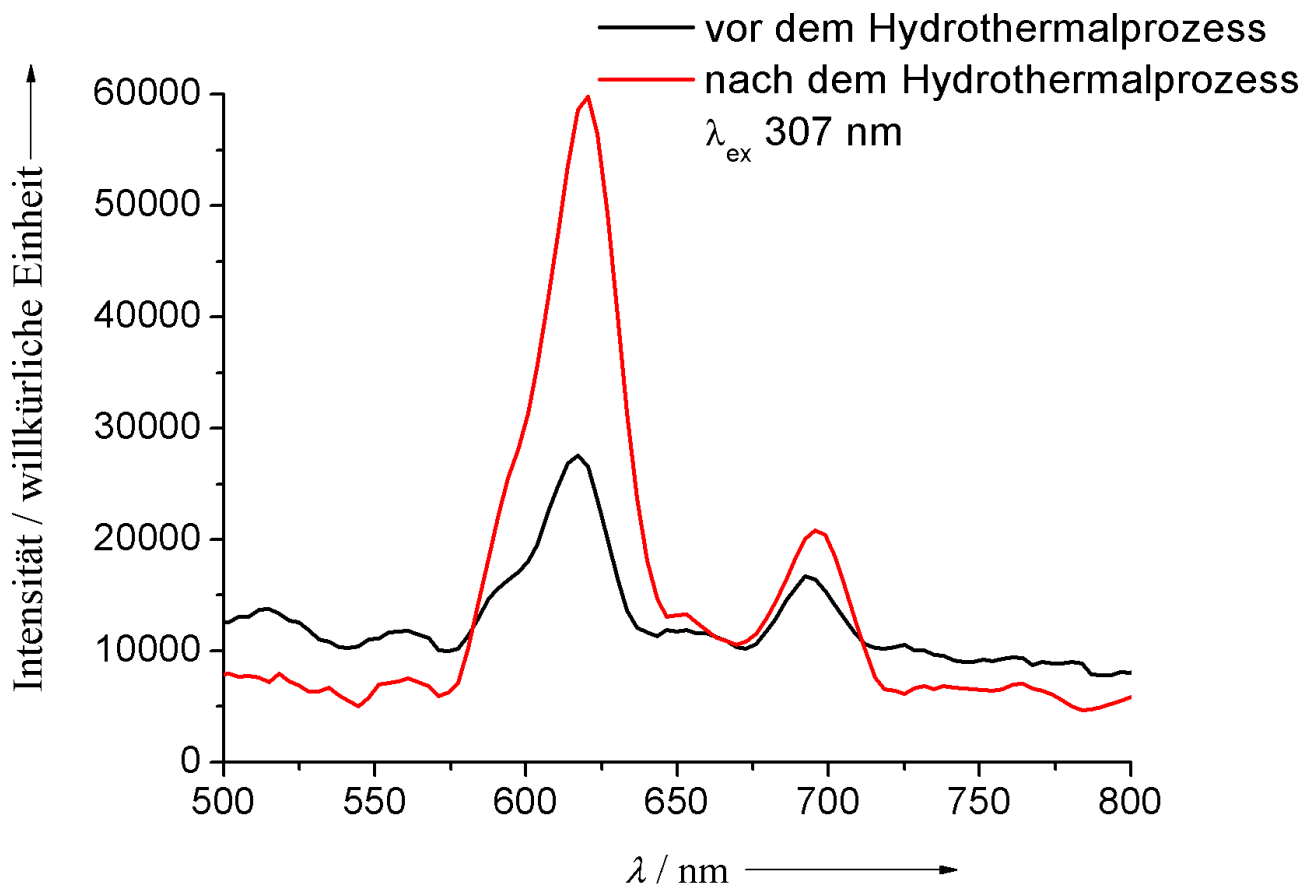


Abbildung 13: Fluoreszenzspektren von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen vor und nach dem Hydrothermalprozess, gemessen als Feststoff.

In Abbildung 13 sieht man den Effekt der erhöhten Kristallinität auf die Fluoreszenzintensität der Nanopartikel. Alle typischen Übergänge des Europiums sind zu erkennen, lediglich der  $^5\text{D}_1 \rightarrow ^7\text{F}_1$ -Übergang wird größtenteils vom sehr breiten  $^5\text{D}_1 \rightarrow ^7\text{F}_2$ -Übergang verdeckt, so dass dieser nur als kleine Schulter an der linken Seite des  $^5\text{D}_1 \rightarrow ^7\text{F}_2$ -Übergangs zu erkennen ist. Während sich die meisten Übergänge kaum in ihrer Intensität verändert haben, wurde die Intensität des  $^5\text{D}_1 \rightarrow ^7\text{F}_2$ -Übergangs durch den Hydrothermalprozess verdoppelt. Daraus lässt sich schließen, dass der  $^5\text{D}_1 \rightarrow ^7\text{F}_2$ -Übergang und wahrscheinlich auch der  $^5\text{D}_1 \rightarrow ^7\text{F}_1$ -Übergang tatsächlich über einen Energietransfer vom Kristallgitter auf das  $\text{Eu}^{3+}$ -Ion angeregt werden, während

die anderen Übergänge direkt angeregt werden, so dass die Kristallinität des Wirtsgitters nur wenig Einfluss auf diese Übergänge hat.

### 4.1.3. Hydroxylapatit-Nanopartikel, dotiert mit Terbium

Terbium-dotierte Materialien emittieren Licht im grünen Bereich des sichtbaren Lichts. Terbium zeigt fünf Übergänge aus dem  $^5D_4$ -Niveau in  $^7F_J$ -Niveaus ( $J = 2, 3, 4, 5, 6$ ), der  $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ -Übergang bei 540-555 nm ist der stärkste. Die Übergänge  $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$  (485-500 nm),  $^5D_4 \rightarrow ^7F_4$  (580-595 nm) und  $^5D_4 \rightarrow ^7F_3$  (615-625 nm) zeigen eine mittlere bis starke Intensität. Der  $^5D_4 \rightarrow ^7F_2$ -Übergang bei 645-655 nm ist der schwächste.<sup>[37]</sup>

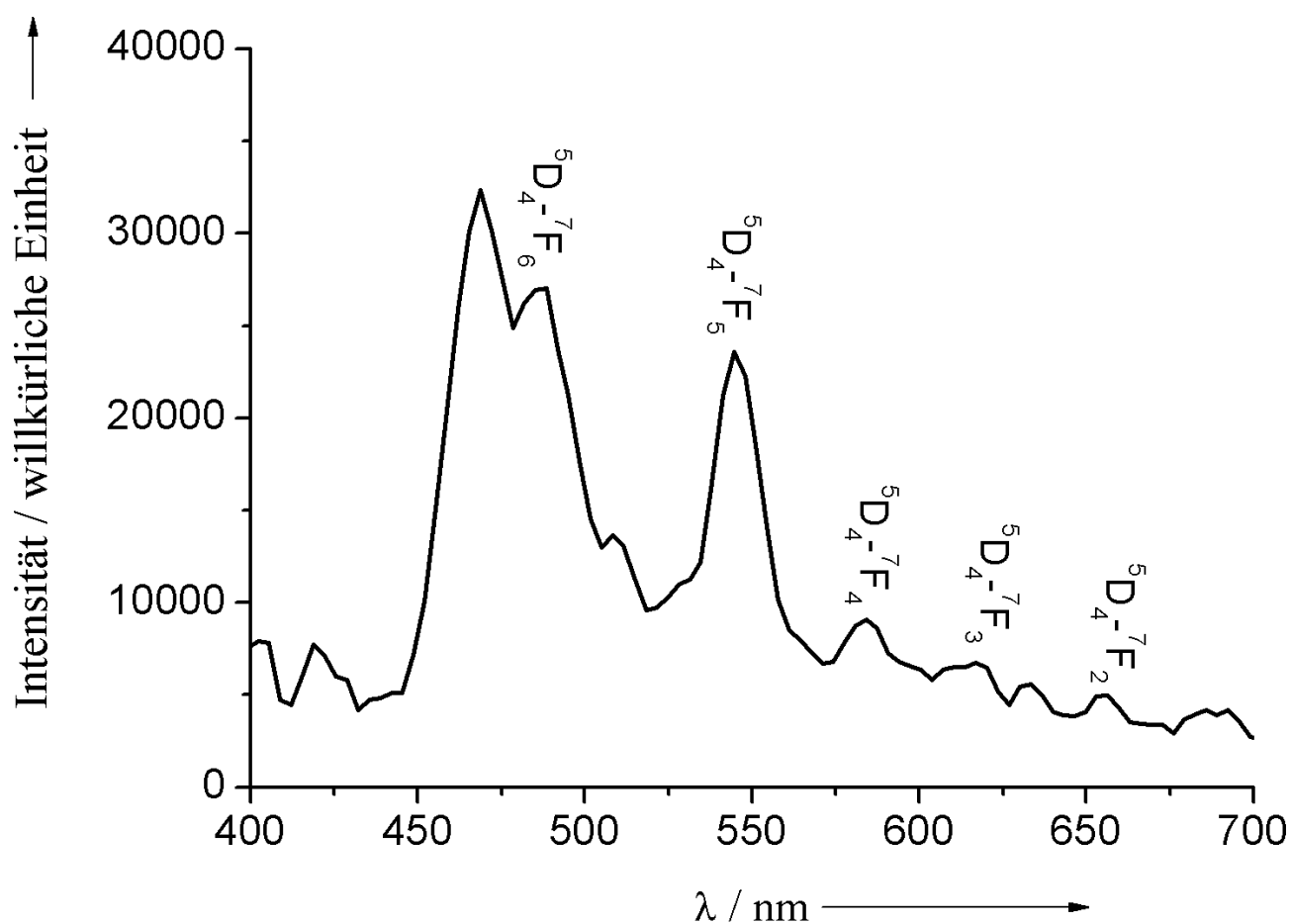


Abbildung 14: Fluoreszenzspektrum von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, dotiert mit 2 mol-%  $\text{Tb}^{3+}$ -Ionen, gemessen als Feststoff mit einer Anregungswellenlänge von 306 nm.

Abbildung 14 zeigt das Fluoreszenzspektrum von  $\text{Tb}^{3+}$ -dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikeln. Alle Übergänge sind im Spektrum zu sehen, der  $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_6$ -Übergang hat allerdings eine stärkere Intensität als der  $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_5$ -Übergang. Die anderen Übergänge zeigen nur eine schwache Intensität.

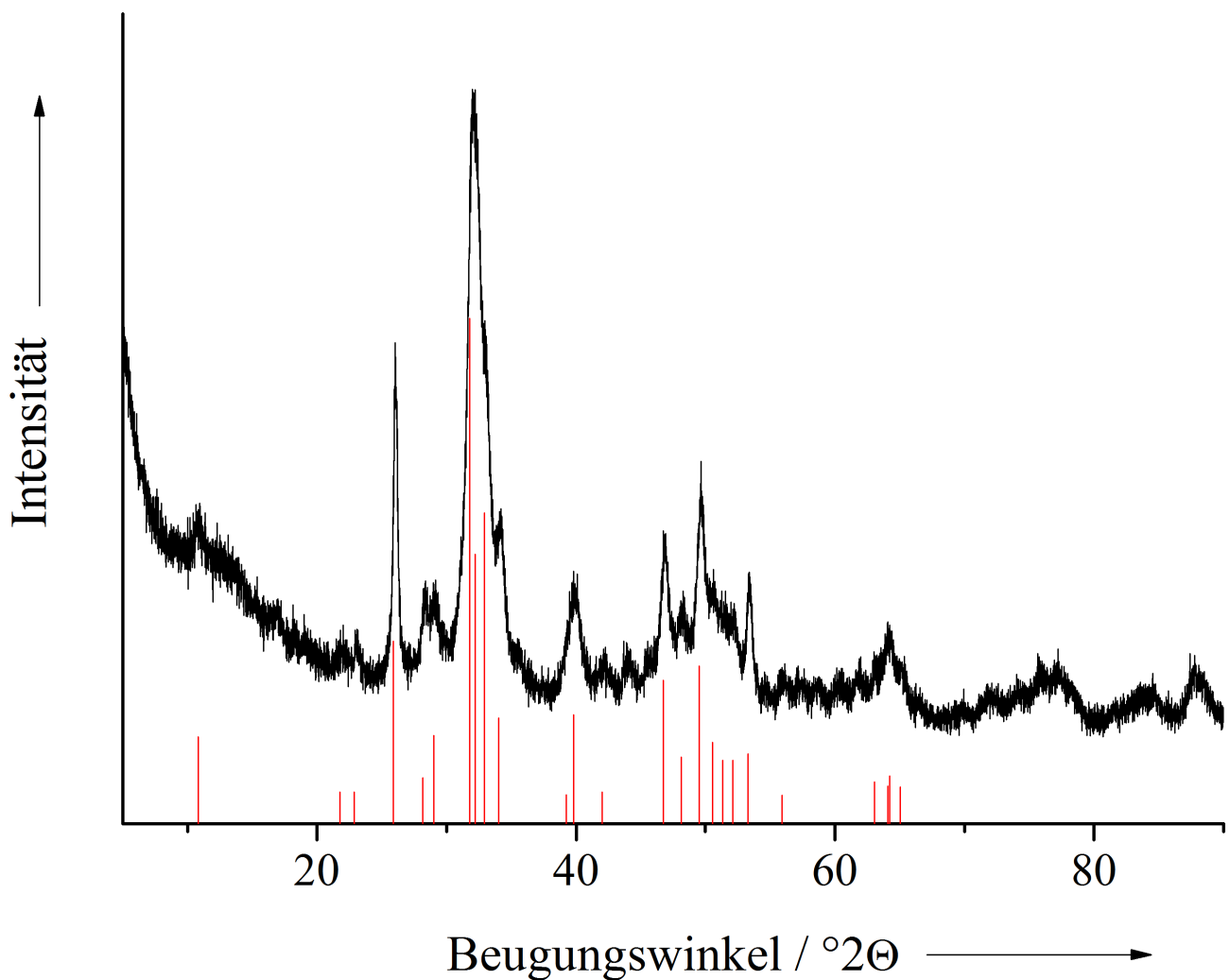


Abbildung 15: Diffraktogramm von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, dotiert mit 2 mol-%  $\text{Tb}^{3+}$ -Ionen (Referenz: Hydroxylapatit, JCDPS #76-0694).

Das Diffraktogramm in Abbildung 15 zeigt nanokristallinen Hydroxylapatit als einzige Phase bei den Terbium-dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikeln.

Um die Fluoreszenzintensität von  $\text{Tb}^{3+}$ -dotierten Materialien zu erhöhen, kann Cer co-dotiert werden.<sup>[43]</sup>

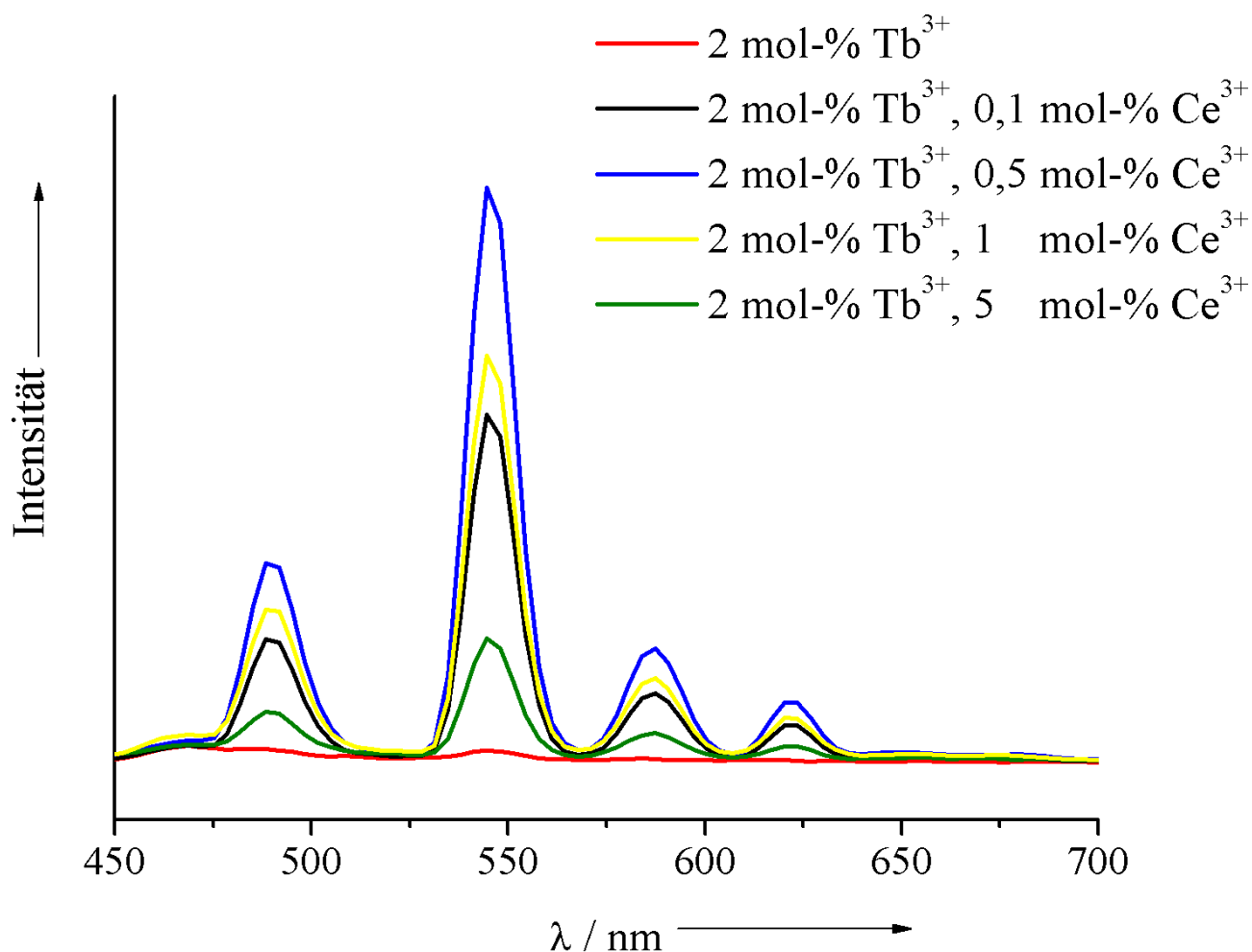


Abbildung 16: Emissionsspektren von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Tb}^{3+}$ -Ionen und unterschiedlichen Mengen  $\text{Ce}^{3+}$ -Ionen, gemessen als Feststoff mit einer Anregungswellenlänge von 306 nm.

Durch die Co-Dotierung mit Cer wird die Fluoreszenzintensität stark erhöht. Die stärkste Erhöhung wird durch eine Co-Dotierung mit 0,5 mol-%  $\text{Ce}^{3+}$ -Ionen erreicht, hier ist die Fluoreszenzintensität des  $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_5$ -Übergang 44 mal höher als die Intensität des entsprechenden Übergangs bei den nur mit Terbium dotierten Nanopartikeln (Abbildung 16). Zudem hat sich das Spektrum bei allen verwendeten Cer-Konzentrationen verändert, so dass der  $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_5$ -Übergang die stärkste Intensität zeigt, der  $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_6$ -Übergang schon eine deutlich geringere Intensität aufweist und der



$^5D_4 \rightarrow ^7F_2$ -Übergang nicht mehr zu erkennen ist.

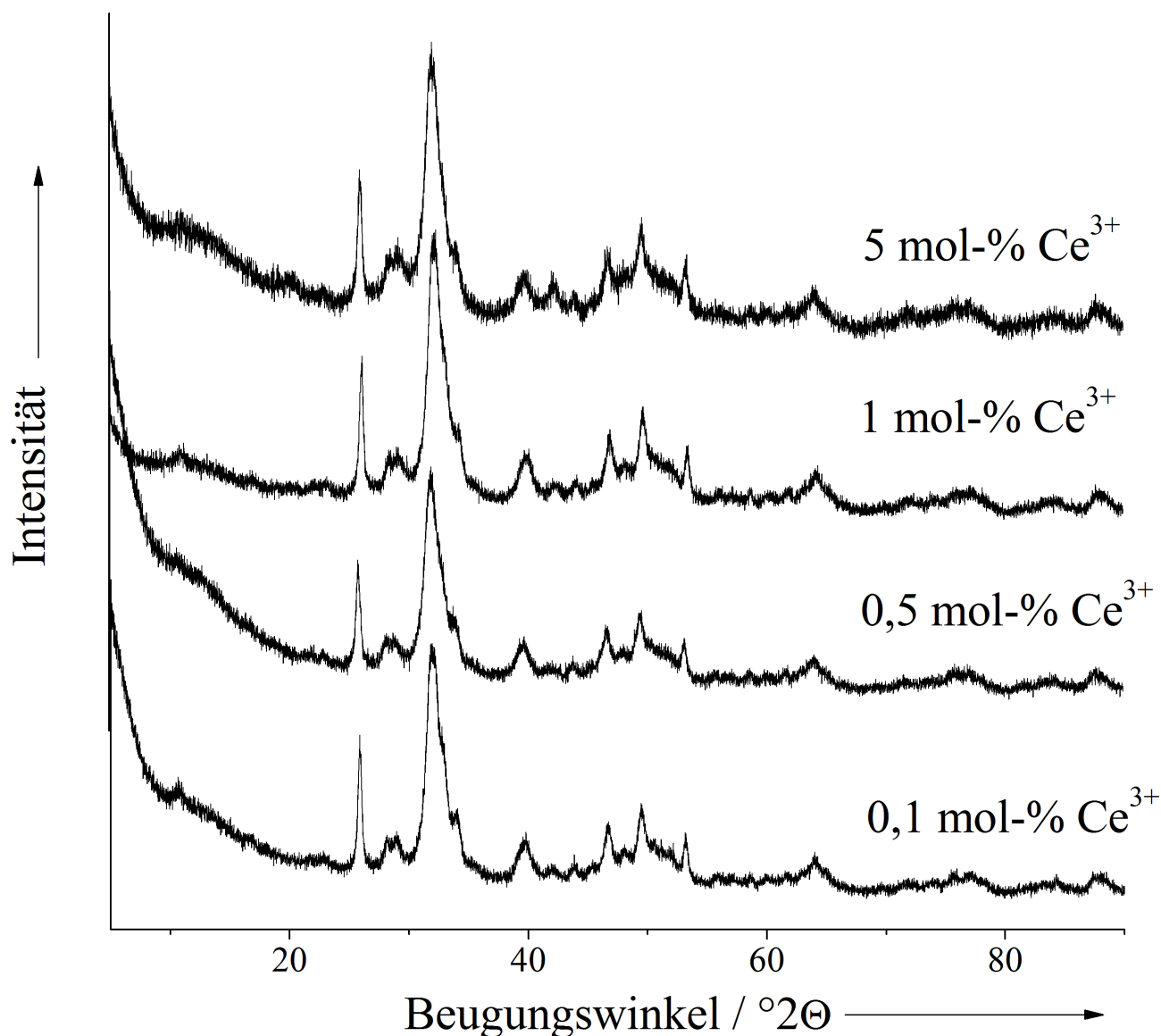


Abbildung 17: Diffraktogramme von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $Tb^{3+}$ -Ionen und unterschiedlichen Mengen  $Ce^{3+}$ -Ionen.

Auch die Co-Dotierung mit  $Ce^{3+}$ -Ionen hat keinen Einfluss auf die Kristallstruktur der Nanopartikel, so ist bei allen  $Ce^{3+}$ -Konzentrationen Hydroxylapatit die einzige Phase. Auch die mit Terbium und Cer co-dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikel wurden einem Hydrothermalprozes unterworfen, um die Kristallinität zu erhöhen.

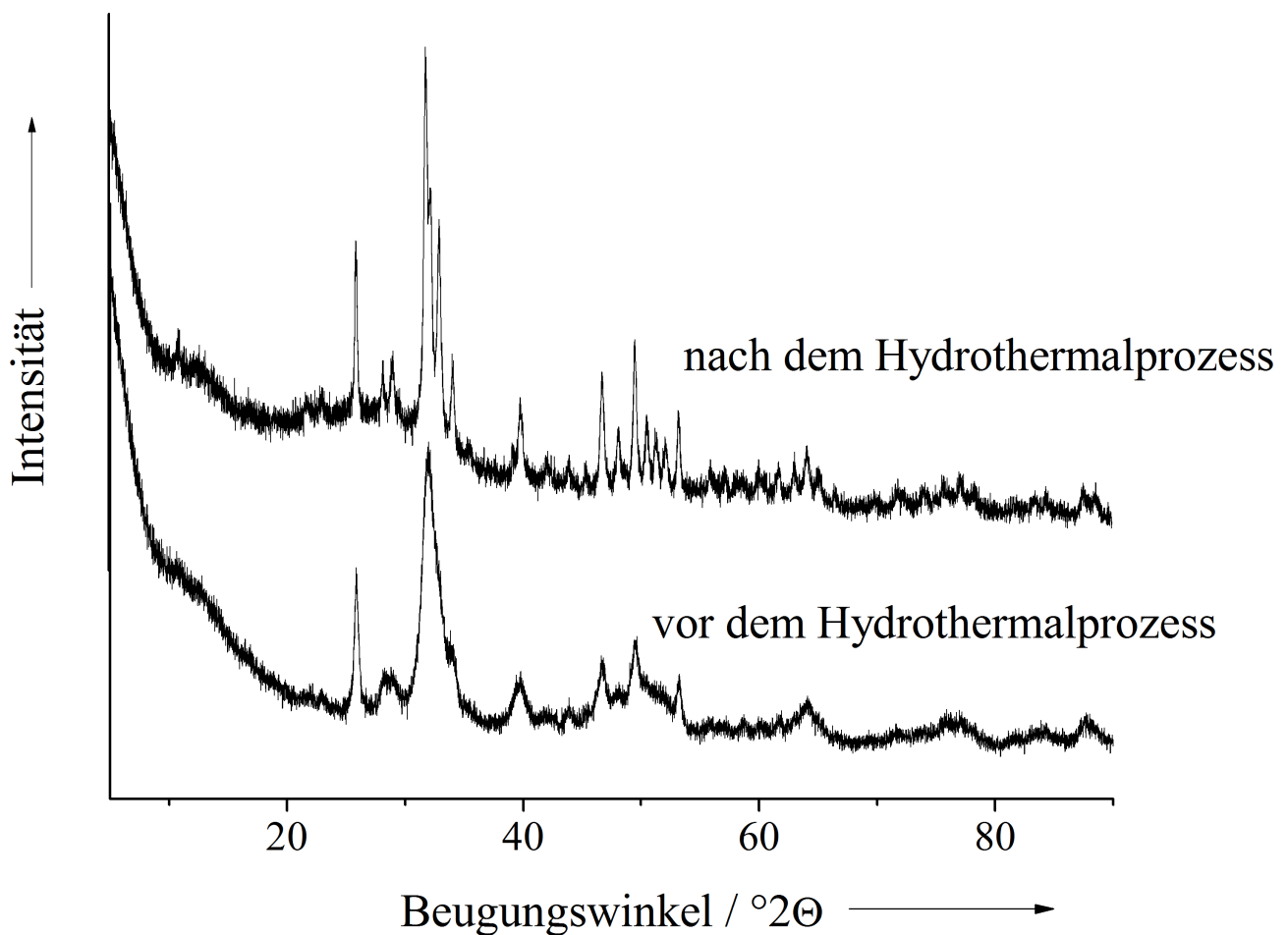


Abbildung 18: Diffraktogramme von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Tb}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Ce}^{3+}$ -Ionen vor dem Hydrothermalprozess (unteres Diffraktogramm) und nach dem Hydrothermalprozess (oberes Diffraktogramm).

Abbildung 18 zeigt die Diffraktogramme von mit Terbium und Cer co-dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikeln vor und nach dem Hydrothermalprozess. Die breiten Reflexe vor dem Hydrothermalprozess zeigen die geringe Kristallinität der Partikel. Das Diffraktogramm zeigt schmale Reflexe nach dem Hydrothermalprozess, die Kristallinität der Partikel ist deutlich gestiegen.

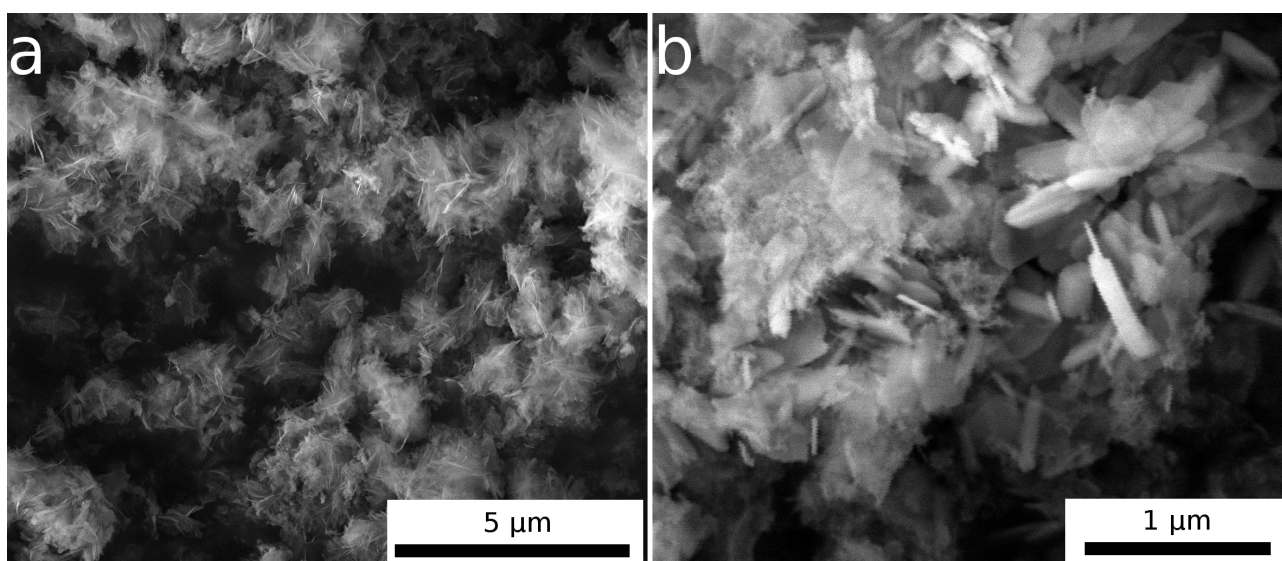


Abbildung 19: REM-Aufnahmen von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Tb}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Ce}^{3+}$ -Ionen vor dem Hydrothermalprozess (a) und nach dem Hydrothermalprozess (b).

Die REM-Aufnahmen zeigen, dass die Partikel vor dem Hydrothermalprozess stark aggregiert sind und eine nadelförmige Morphologie aufweisen (Abbildung 19 a). Die Partikel sind 400-600 nm lang, die Breite lässt sich durch die Aggregation der Partikel nicht bestimmen. Nach dem Hydrothermalprozess weisen die Partikel unterschiedliche Morphologien auf. Einige Partikel sind stäbchenförmig, es sind aber auch Partikel zu sehen, die eine plättchenförmige Morphologie aufweisen. Die Partikel sind 100-150 nm breit und 200-500 nm lang.

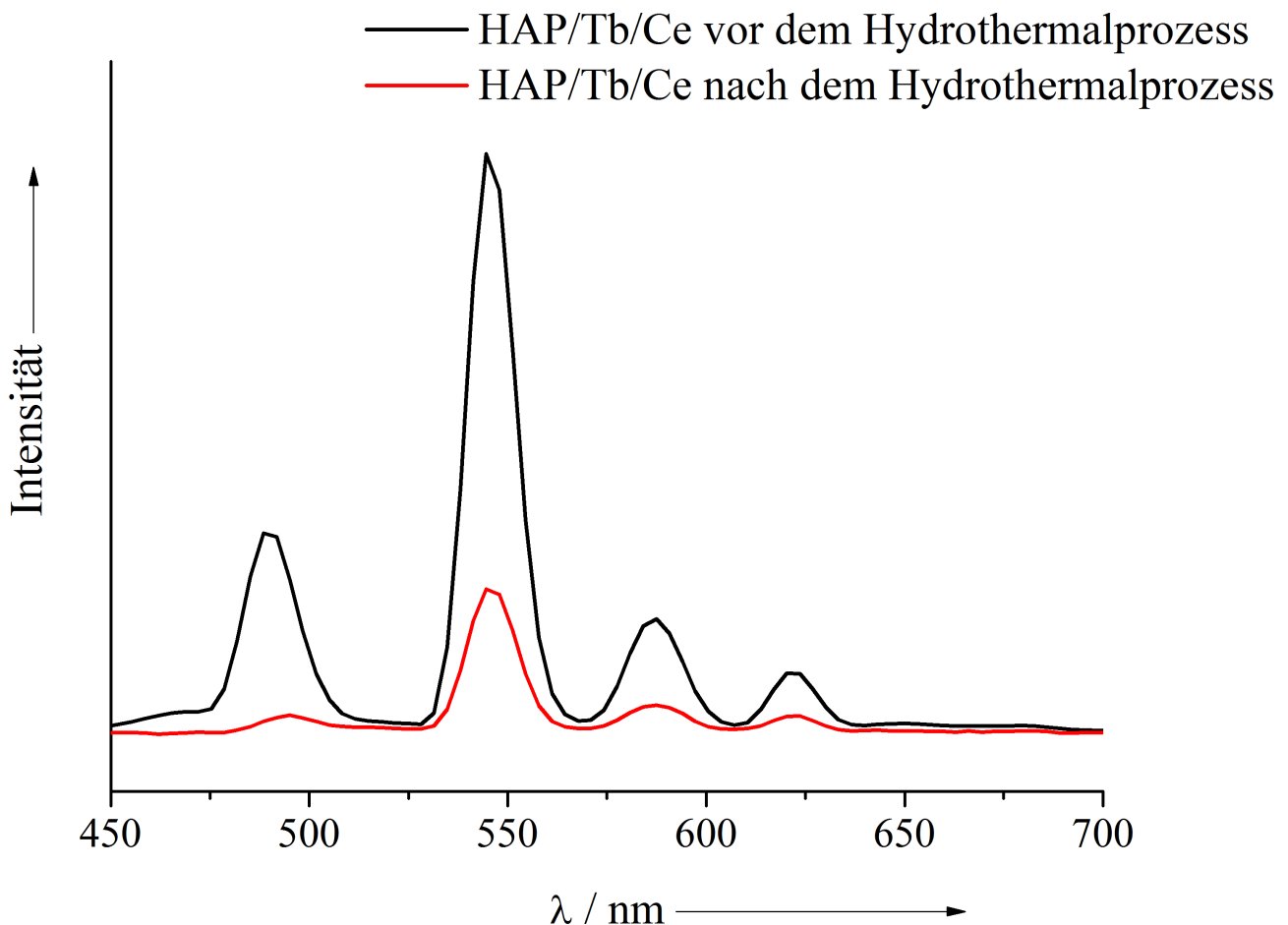


Abbildung 20: Fluoreszenzspektren von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Tb}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Ce}^{3+}$ -Ionen vor dem Hydrothermalprozess (schwarze Kurve) und nach dem Hydrothermalprozess (rote Kurve). Es wurde die Fluoreszenz des Feststoffs bei einer Anregungswellenlänge von 306 nm gemessen.

Die Fluoreszenzintensität ist nach dem Hydrothermalprozess auf ein Viertel der ursprünglichen Intensität vor dem Hydrothermalprozess gesunken. Dies deutet darauf hin, dass das Kristallgitter nur teilweise an der Anregung der  $\text{Tb}^{3+}$ -Ionen beteiligt ist. Der Hauptteil der eingestrahlten Energie wird direkt von den  $\text{Ce}^{3+}$ -Ionen absorbiert und zum Terbium übertragen. Möglicherweise werden die  $\text{Ce}^{3+}$ -Ionen durch den Hydrothermalprozess zu  $\text{Ce}^{4+}$ -Ionen oxidiert.  $\text{Ce(IV)}$  hat keine f-Elektronen mehr, so dass auch kein Energietransfer mehr stattfinden kann.

#### 4.1.4. Hydroxylapatit-Nanopartikel, dotiert mit Dysprosium

Dysprosium wird hauptsächlich als Absorber im 2,8  $\mu\text{m}$ -Wellenlängenbereich verwendet.<sup>[44]</sup> Es zeigt jedoch auch Fluoreszenzeigenschaften im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums.<sup>[45, 46]</sup> Dysprosium zeigt drei Übergänge, den  $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^6\text{H}_{15/2}$ -Übergang bei 470-480 nm, den  $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^6\text{H}_{13/2}$ -Übergang bei 560-585 nm und den  $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^6\text{H}_{11/2}$ -Übergang bei 660 nm. Abhängig vom Wirtsgitter sind allerdings nicht alle Übergänge zu beobachten.<sup>[47, 48]</sup>

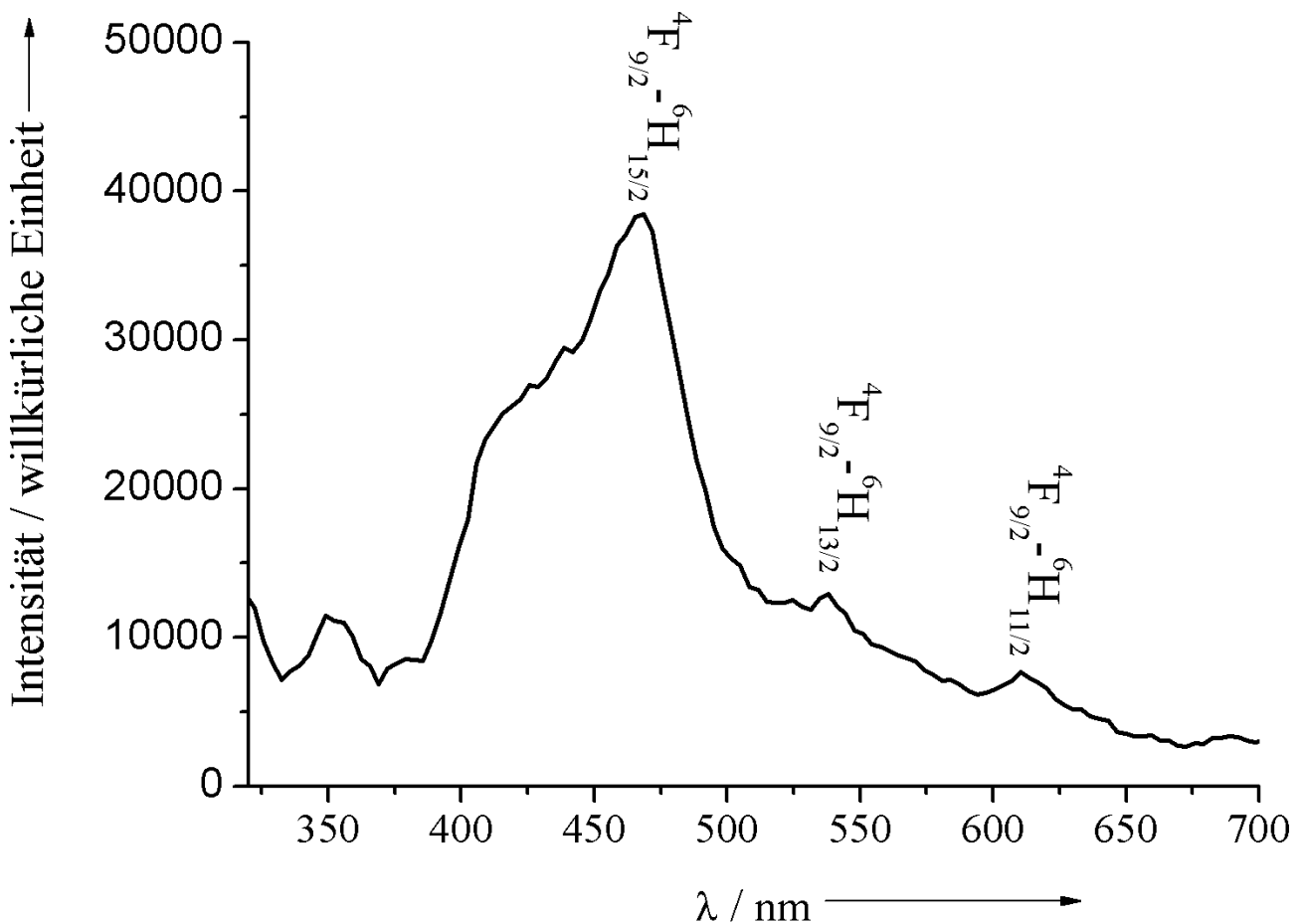


Abbildung 21: Fluoreszenzspektrum von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, dotiert mit 2 mol-%  $\text{Dy}^{3+}$ -Ionen, gemessen als Feststoff mit einer Anregungswellenlänge von 295 nm.

Abbildung 21 zeigt das Fluoreszenzspektrum von  $\text{Dy}^{3+}$ -dotierten Hydroxylapatit-Na-

nopartikeln. Es ist eine große Bande zu erkennen, deren Maximum bei 469 nm liegt. Die Bande weist noch eine Schulter bei 412 nm auf. Diese Bande kann dem  $^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{15/2}$ -Übergang zugeordnet werden. Die anderen beiden Übergänge sind nur als kleine Banden bei 538 nm ( $^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{13/2}$ -Übergang) und bei 610 nm ( $^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{11/2}$ -Übergang) zu sehen. Zusätzlich ist noch eine Bande bei 350 nm zu erkennen. Während der  $^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{15/2}$ -Übergang gut mit den Daten aus der Literatur übereinstimmt, sind die Maxima der beiden anderen Übergänge deutlich verschoben.

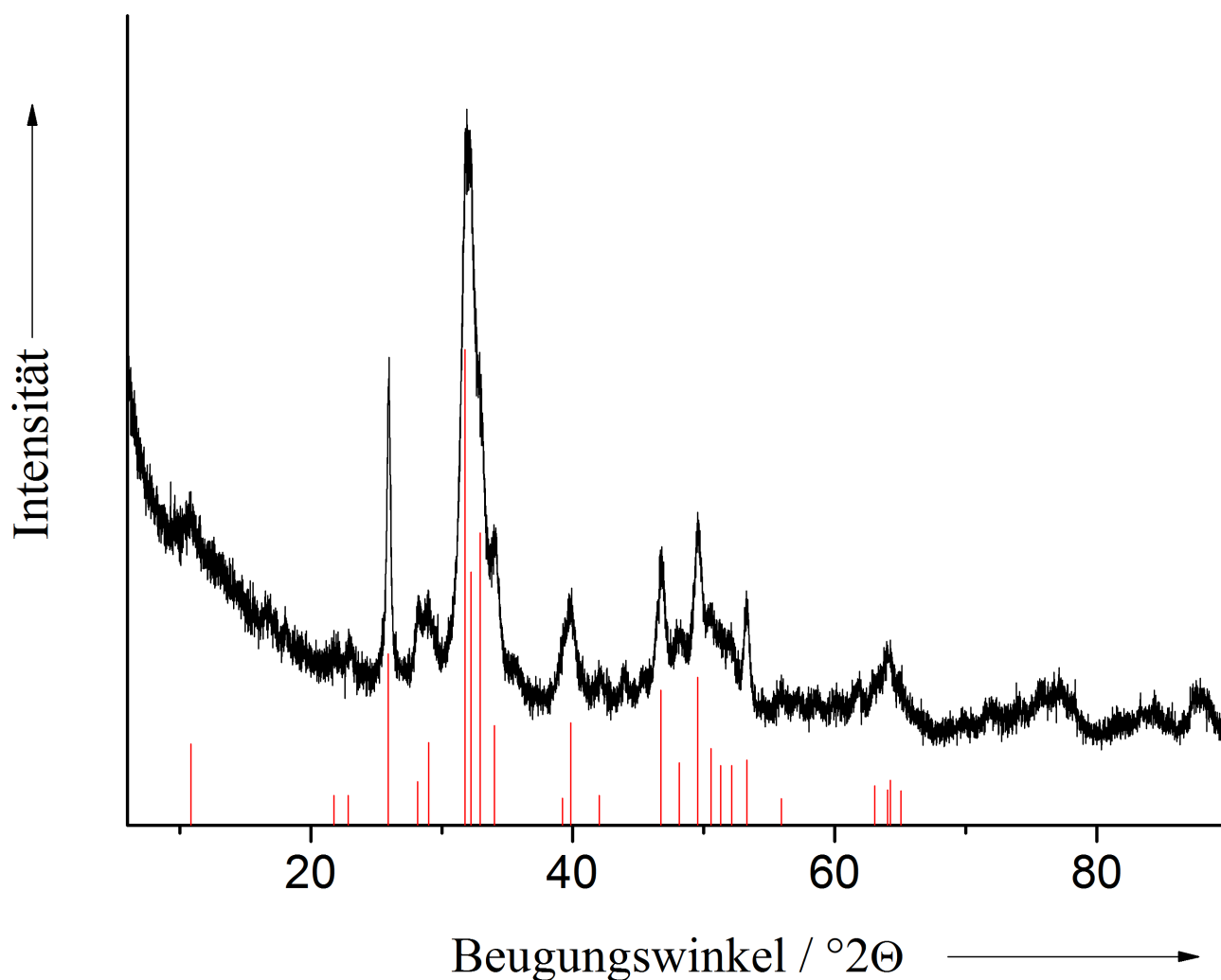


Abbildung 22: Diffraktogramm von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, dotiert mit 2 mol-%  $Dy^{3+}$ -Ionen (Referenz: Hydroxylapatit, JCDPS #76-0694).

Das Diffraktogramm der  $\text{Dy}^{3+}$ -dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikel ist in Abbildung 22 zu sehen. Die Partikel sind nanokristallin, und Hydroxylapatit ist die einzige Phase; es hat sich kein Dysprosiumphosphat gebildet.

Auch bei den Dy-dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikeln sollte die Fluoreszenzintensität durch die Co-Dotierung mit einem Sensibilisator erhöht werden. Als Sensibilisator wurde Yttrium verwendet.

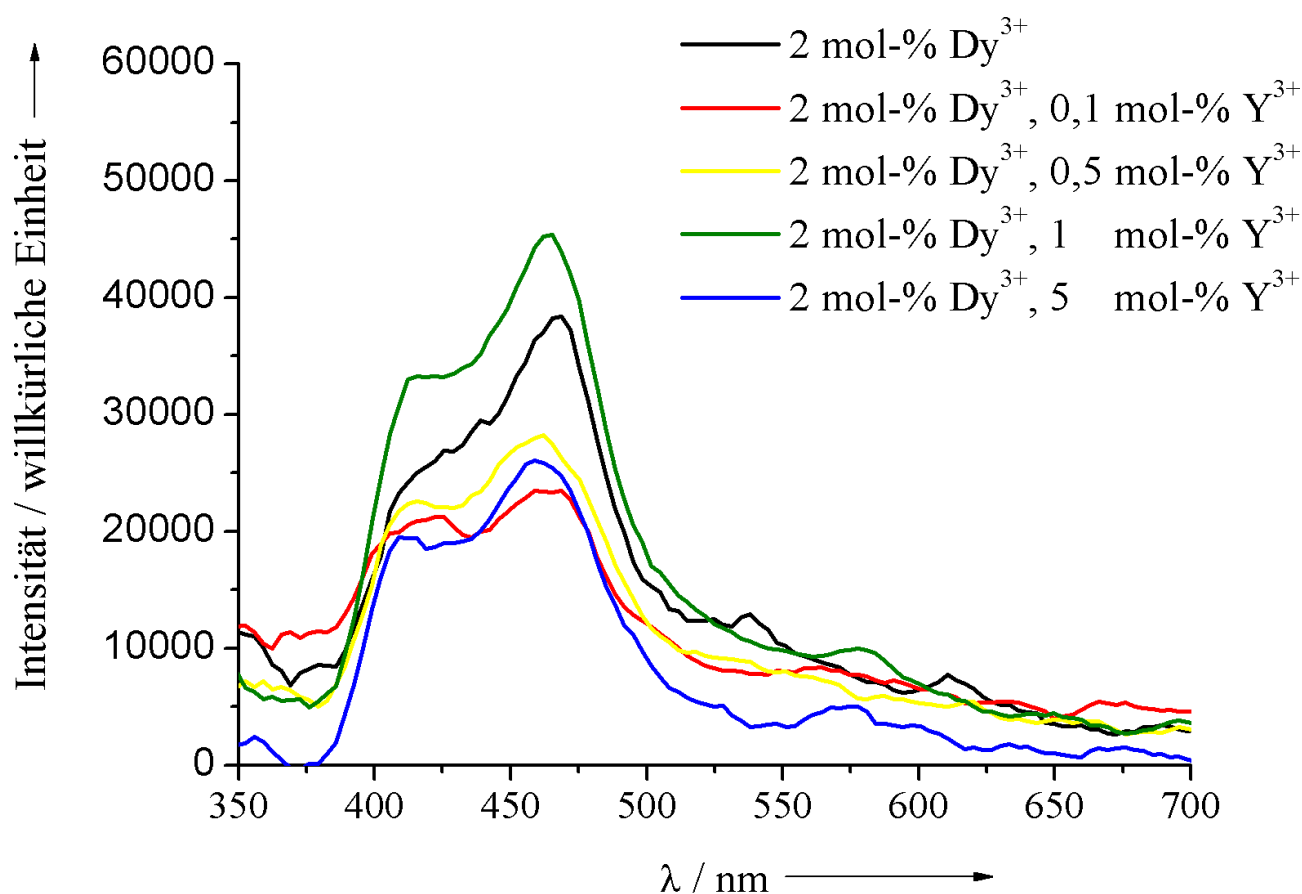


Abbildung 23: Fluoreszenzspektren von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, dotiert mit 2 mol-%  $\text{Dy}^{3+}$ -Ionen und co-dotiert mit unterschiedlichen Mengen an  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen, gemessen als Feststoff mit einer Anregungswellenlänge von 295 nm.

Abbildung 23 zeigt die Fluoreszenzspektren von  $\text{Dy}^{3+}$ -dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikeln, die mit unterschiedlichen Mengen  $\text{Y}^{3+}$  co-dotiert wurden. Bei Zugabe von 0,1 und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$  verringert sich die Fluoreszenzintensität. Durch die Zuga-

be von 1 mol-%  $\text{Y}^{3+}$  wird die Fluoreszenzintensität etwas erhöht, und durch die Codotierung von 5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$  wird sie wieder verringert. Die Erhöhung der Fluoreszenzintensität durch die Co-Dotierung mit Yttrium ist bei  $\text{Dy}^{3+}$ -dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikeln nicht so hoch wie bei  $\text{Eu}^{3+}$ -dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikeln.

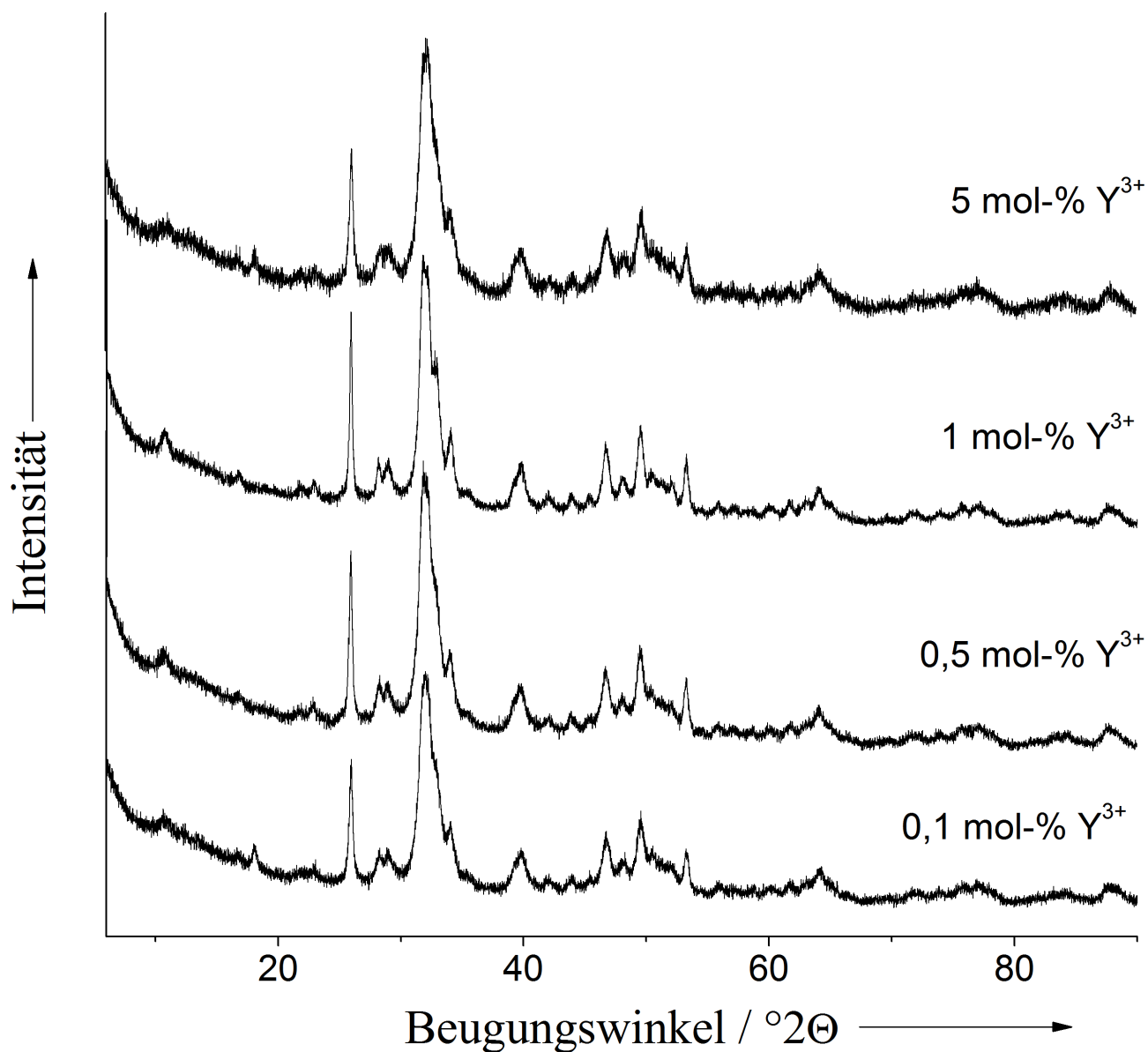


Abbildung 24: Diffraktogramme von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, dotiert mit 2 mol-%  $\text{Dy}^{3+}$ -Ionen und unterschiedlichen Mengen  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen (Referenz: Hydroxylapatit, JCDPS #76-0694).



In Abbildung 24 sind die Diffraktogramme der Dysprosium-dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikel nach der Co-Dotierung mit unterschiedlichen Mengen an Yttrium zu sehen. In allen Fällen ist Hydroxylapatit die einzige Phase. Die Co-Dotierung mit Yttrium hat keinen Einfluss auf die Kristallinität der Nanopartikel.

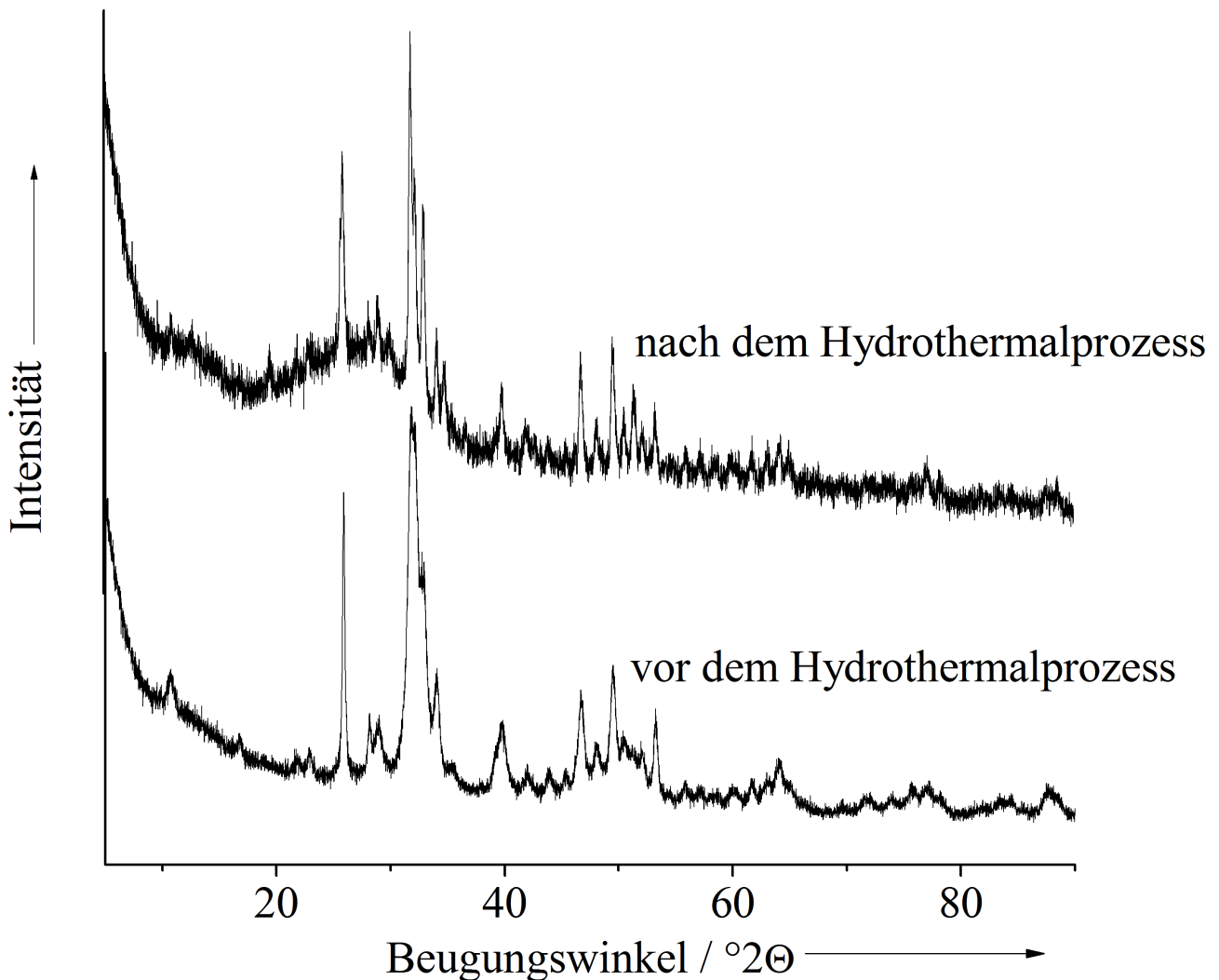


Abbildung 25: Diffraktogramme von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Dy}^{3+}$ -Ionen und 1 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen vor dem Hydrothermalprozess (unteres Diffraktogramm) und nach dem Hydrothermalprozess (oberes Diffraktogramm).

Aus den breiten Reflexen sind durch den Hydrothermalprozess schmale Reflexe geworden. Dies zeigt die Erhöhung der Kristallinität der Nanopartikel an.

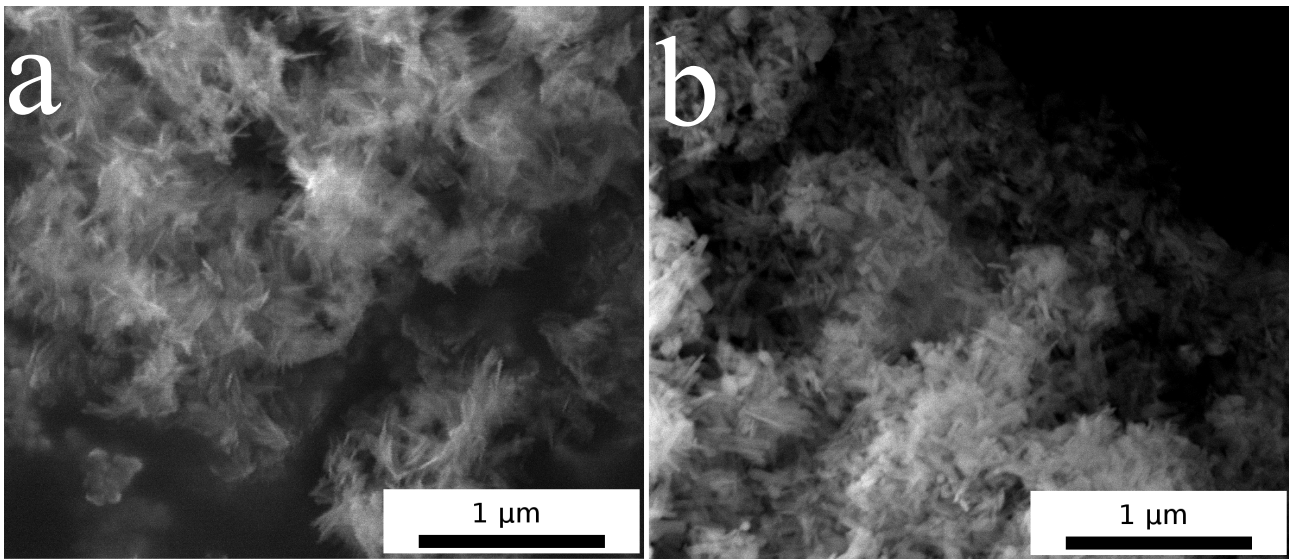


Abbildung 26: REM-Aufnahmen von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Dy}^{3+}$ -Ionen und 1 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen vor dem Hydrothermalprozess (a) und nach dem Hydrothermalprozess (b).

Vor dem Hydrothermalprozess sind die Partikel nadelförmig mit einer Länge von 50-100 nm, aufgrund der Aggregation der Partikel lässt sich die Breite nicht bestimmen (Abbildung 26 a). Nach dem Hydrothermalprozess sind die Partikel stäbchenförmig, die Partikel haben sich in ihrer Länge nicht verändert, nur die Breite der Partikel hat sich verändert.

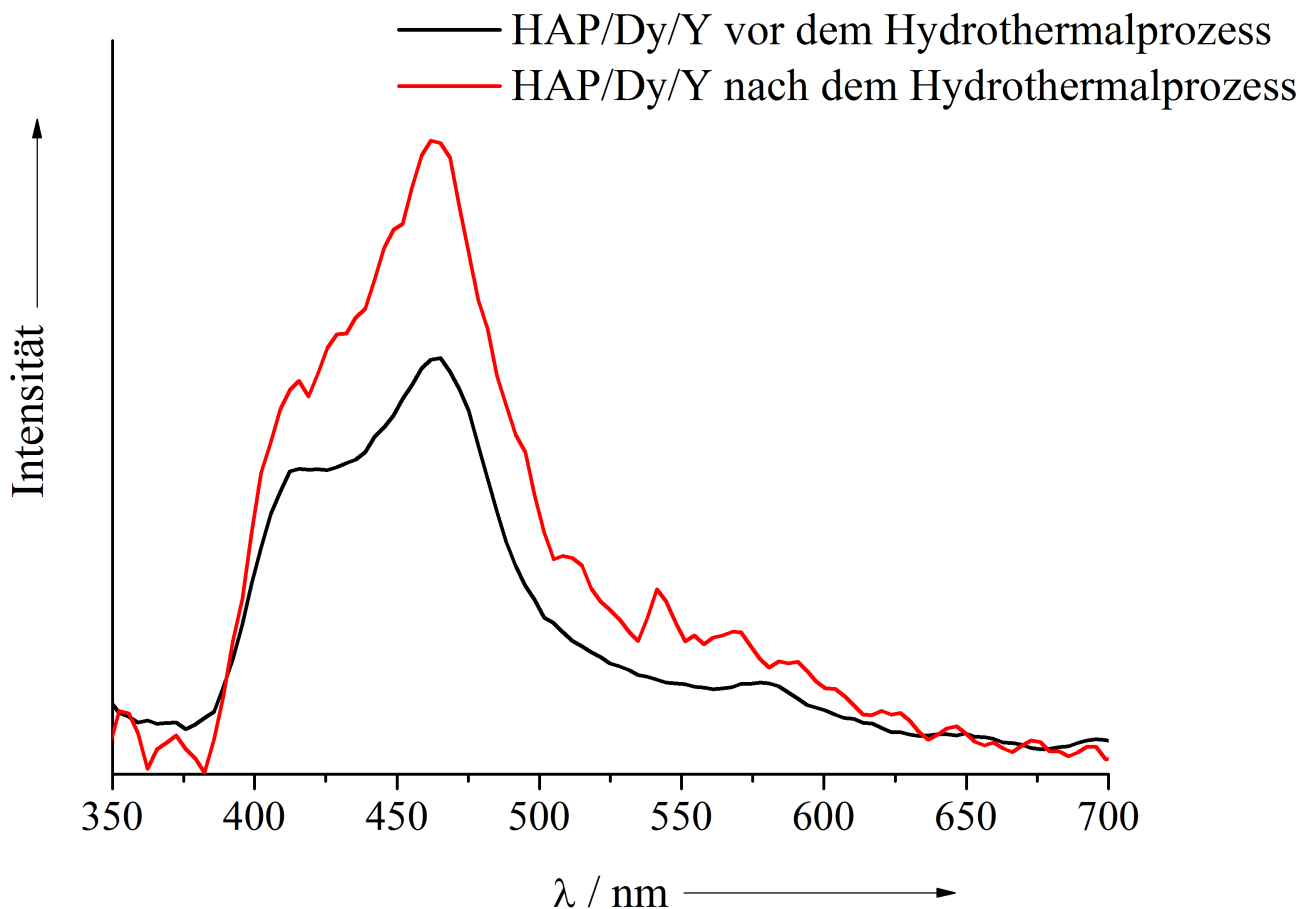


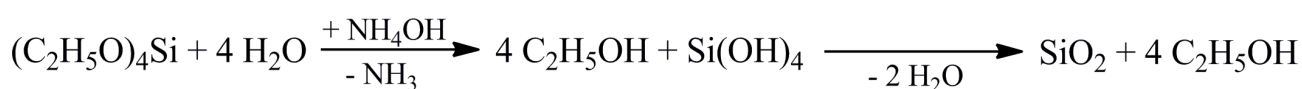
Abbildung 27: Fluoreszenzspektren von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Dy}^{3+}$ -Ionen und 1 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen vor dem Hydrothermalprozess (schwarze Kurve) und nach dem Hydrothermalprozess (rote Kurve), gemessen als Feststoff mit einer Anregungswellenlänge von 295nm.

Durch den Hydrothermalprozess wurde die Fluoreszenzintensität des  $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^6\text{H}_{15/2}$ -Übergangs um 50 % erhöht. Die anderen beiden Übergänge sind weiterhin nur sehr schwach.

#### 4.1.5. Lanthanoid-dotierte Kern-Schale-Hydroxylapatit-Nanopartikel

Um die Fluoreszenzintensität weiter zu erhöhen, müssen die Partikel vor äußeren Einflüssen geschützt werden. Wie schon in Abbildung 7 schematisch dargestellt, be-

finden sich durch die hohe spezifische Oberfläche auch viele Lanthanoid-Ionen an der Oberfläche der Partikel. Diese können durch einen Energietransfer zur Oberfläche die zugeführte Energie strahlungslos wieder abgeben. Um diese Oberflächenatome zu schützen, kann man die Nanopartikel mit einer Schale umhüllen.<sup>[25, 49-51]</sup> Die Bildung einer Silikatschale ist eine einfache Möglichkeit, Kern-Schale Partikel zu synthetisieren. Über den Stöber-Prozess werden SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel durch eine Hydrolyse von Kieselsäureestern gebildet. Dieser Prozess läuft typischerweise basenkatalysiert in einer Mischung aus Ethanol und Wasser ab.<sup>[52]</sup>



Die Reaktionsgleichung am Beispiel von Tetraethylorthosilikat (TEOS) zeigt, dass sich katalysiert durch Hydroxid bei der Hydrolyse zunächst Kieselsäure und Ethanol bilden. Die Kieselsäure kondensiert dann unter Wasserabgabe zu SiO<sub>2</sub>. Durch das Anlagern von TEOS an die Oberfläche von Nanopartikeln kann man diesen Prozess nutzen, um Nanopartikel mit einer Silikatschale zu umhüllen.<sup>[53-56]</sup> Um die synthetisierten Hydroxylapatit-Nanopartikel nach dem Hydrothermalprozess in Dispersion zu stabilisieren, müssen diese mit einem Polymer funktionalisiert werden. PEI hat den Vorteil, dass es die Nanopartikel gut stabilisiert, zudem gibt es durch die positive Ladung des Polymers auch noch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Kieselsäureester, so dass dieser sich an die Partikeloberfläche anlagern kann.

### 4.1.6. Experimenteller Teil

Von den in Kapitel 4.1 synthetisierten Partikeln werden 80 mg in 50 mL reinem Ethanol redispergiert und die Dispersion mit Ethanol auf 100 mL aufgefüllt. Dann werden unterschiedliche Mengen an TEOS (0,05 Vol.-% bis 1 Vol.-%) zugegeben und das Gemisch für 24 Stunden gerührt. Anschließend wird die Dispersion bei 2540 g für 60 Minuten zentrifugiert, zweimal in Ethanol und einmal in Wasser redispergiert und jeweils wieder abzentrifugiert, im Anschluss werden die Partikel gefriergetrocknet.

#### 4.1.7. Ummantelung der Lanthanoid-dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikel mit einer Silikatschale durch die Kondensation von TEOS

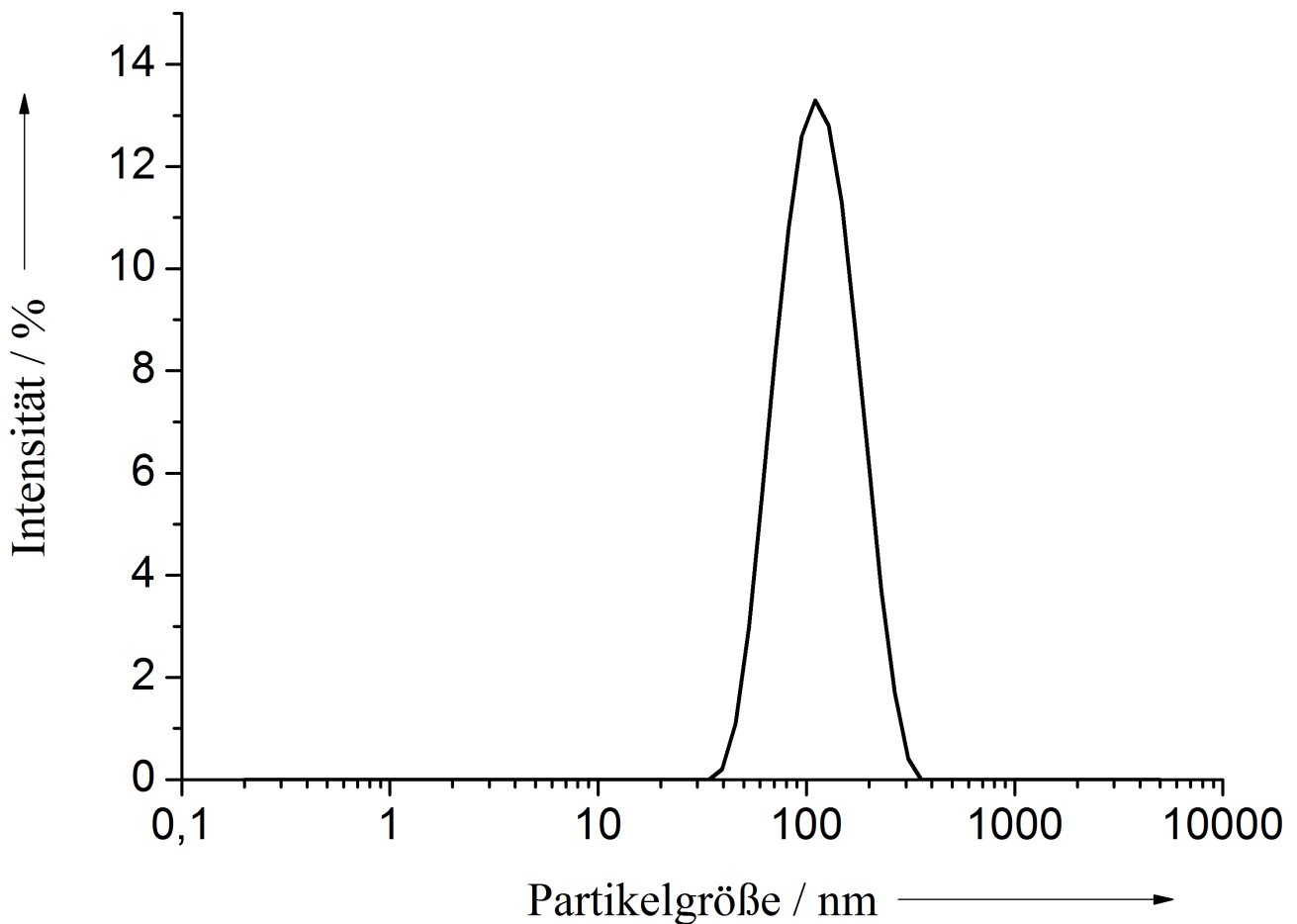


Abbildung 28: DLS-Messung der Hydroxylapatit-Nanopartikel, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen nach dem Hydrothermalprozess und der Funktionalisierung mit PEI.

In Abbildung 28 ist die Größenbestimmung der Partikel über eine DLS-Messung zu sehen. Die durchschnittliche Größe der Partikel beträgt nach dieser Messung 107 nm mit einem PDI von 0,17. Die Partikel erscheinen größer als in den Elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Dies wird durch das an der Partikeloberfläche adsorbierte Polymer verursacht. Während im Elektronenmikroskop die getrockneten Partikel betrachtet werden, bei denen durch das Hochvakuum die Polymerhülle kollabiert ist,

misst man mit der DLS den hydrodynamischen Radius in Dispersion. In der Dispersion quillt das Polymer auf, so dass die Partikel größer erscheinen als im Elektronenmikroskop.

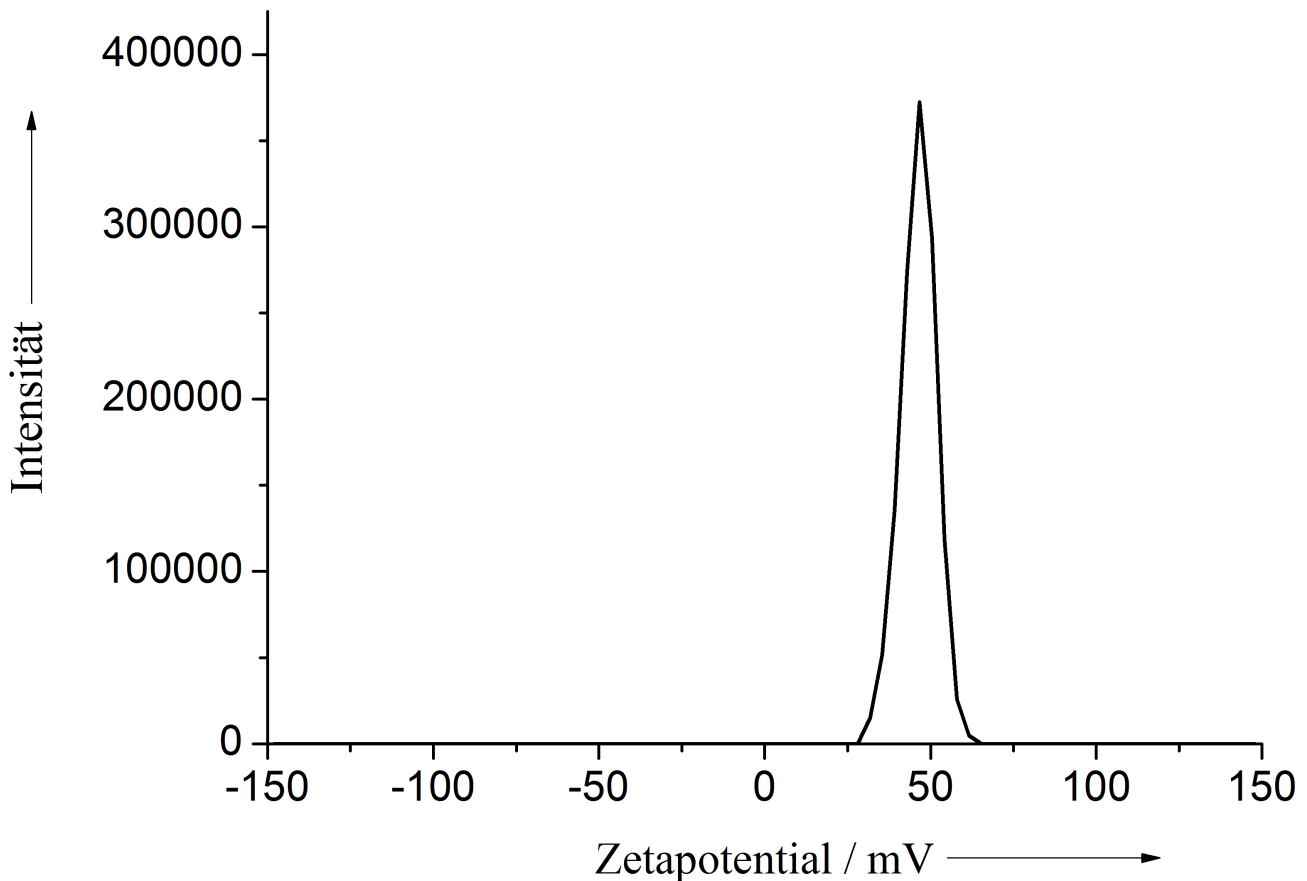


Abbildung 29: Zetapotential der Hydroxylapatit-Nanopartikel, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen nach dem Hydrothermalprozess und der Funktionalisierung mit PEI.

Das Zetapotential der Nanopartikel beträgt +47 mV, wie in Abbildung 29 zu sehen ist. In mehreren Messungen zeigte sich, dass das Zetapotential der mit PEI funktionalisierten Nanopartikel zwischen +35 mV und +50 mV schwankt. Diese Schwankung lässt sich durch die unterschiedliche Kettenlänge der Polymerstränge erklären. Sind kürzere Polymerstränge an der Partikeloberfläche adsorbiert, so befinden sich dort auch weniger Ladungsträger, das Zetapotential ist etwas niedriger.

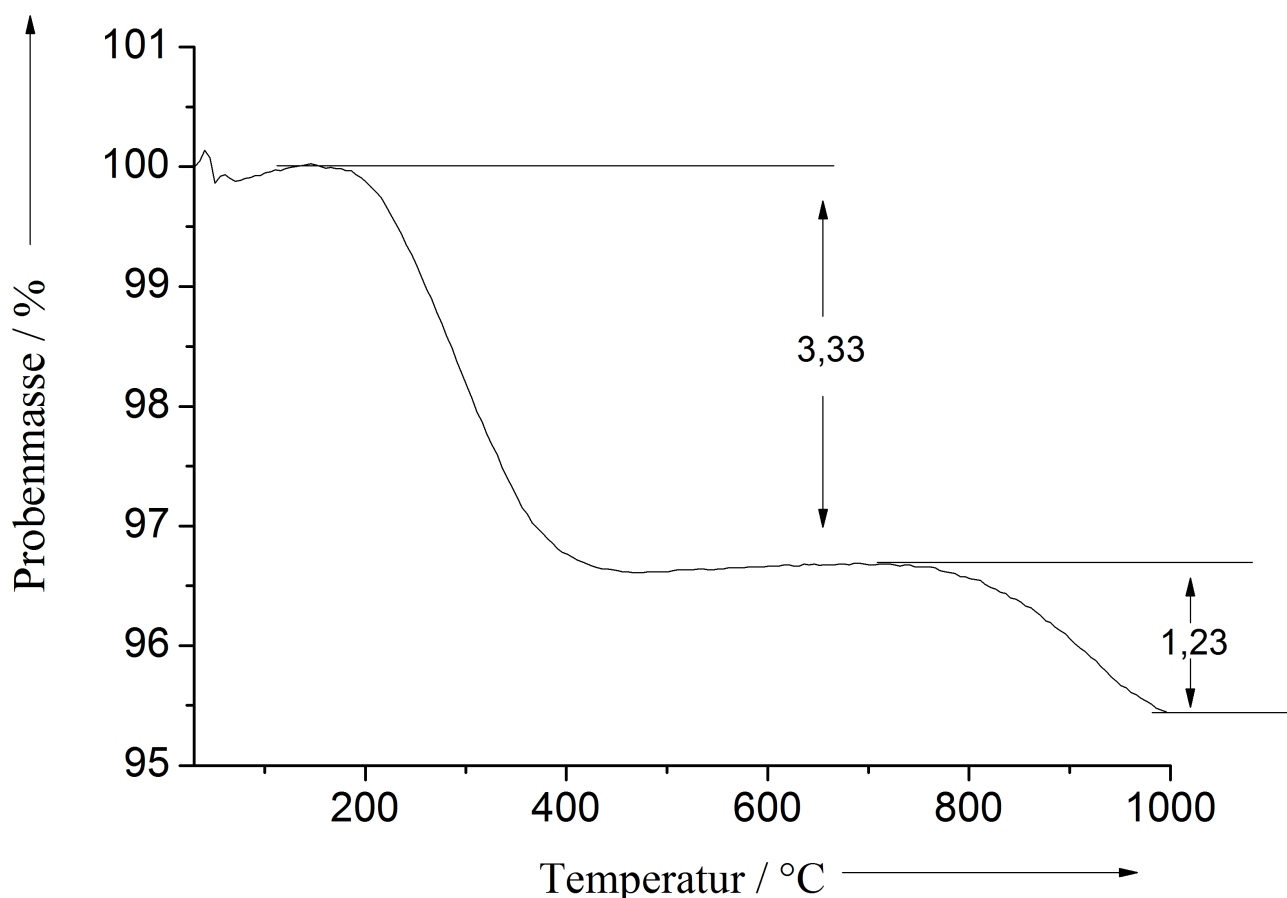


Abbildung 30: Thermogramm von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen und funktionalisiert mit PEI, gemessen in einer Sauerstoffatmosphäre ( $50 \text{ mL min}^{-1}$ ) mit einer Heizrate von  $1 \text{ K min}^{-1}$ .

Das Thermogramm in Abbildung 30 zeigt die Zusammensetzung der funktionalisierten Nanopartikel. Insgesamt wird beim Aufheizen der Probe ein Massenverlust von 4,6 Gew.-% detektiert. Dieser teilt sich in zwei Stufen auf. Zuerst wird ab einer Temperatur von  $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$  das Polymer verbrannt. Das Polymer hat einen Massenanteil von 3,3 Gew.-% der eingewogenen Gesamtmasse. Die zweite Stufe beginnt bei  $720 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Hier verbrennen noch weitere 1,2 Gew.-%. Die zweite Stufe zeigt aus dem Material entweichendes  $\text{CO}_2$ , das aus eingelagertem  $\text{CO}_3^{2-}$  entsteht.

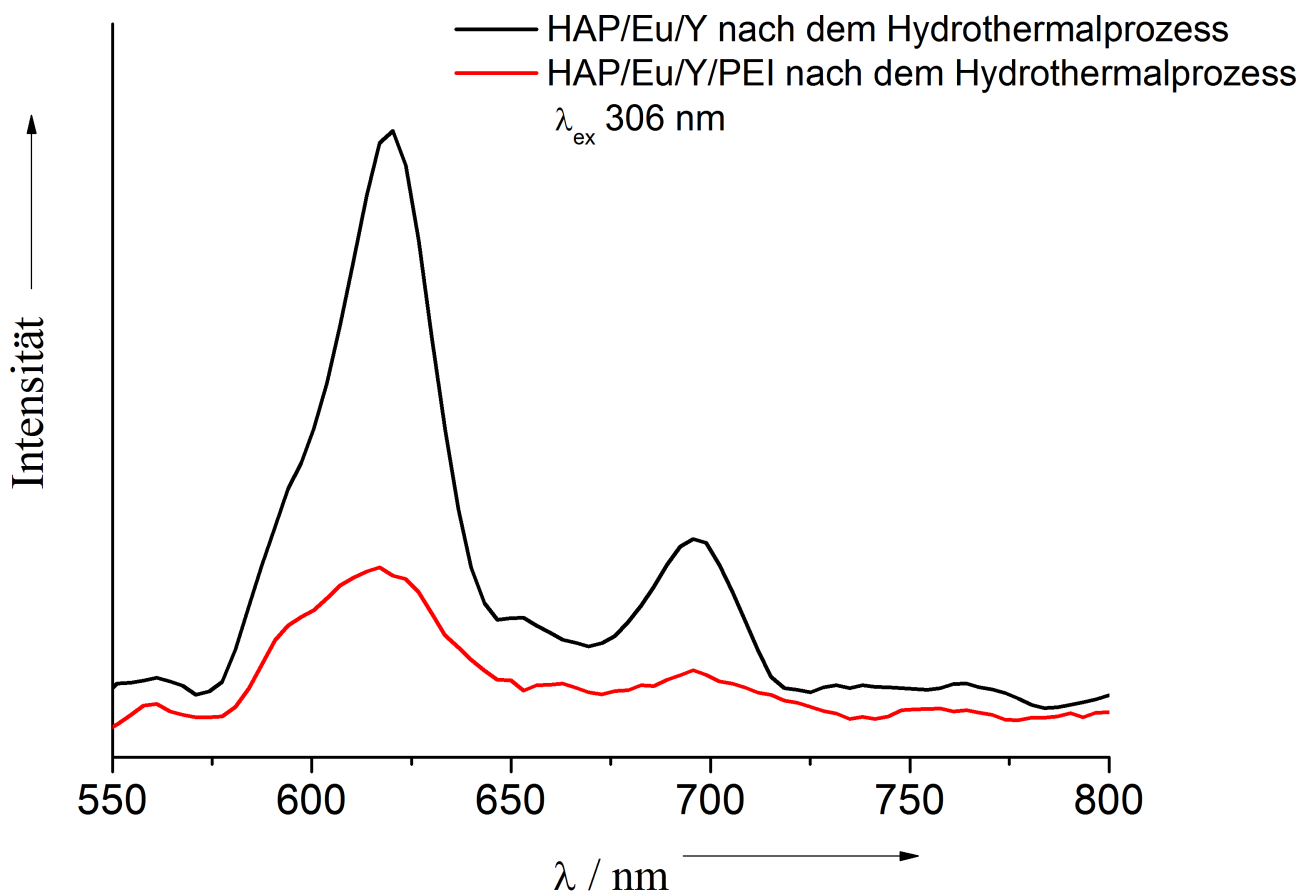


Abbildung 31: Fluoreszenzspektren von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen nach dem Hydrothermalprozess ohne PEI (schwarze Kurve) und mit PEI (rote Kurve), gemessen als Feststoff.

In Abbildung 31 ist der Einfluss des Polymers auf die Fluoreszenzintensität der Nanopartikel zu sehen. Durch die Adsorption des Polymers an der Partikeloberfläche ist die Fluoreszenzintensität auf ein Drittel der ursprünglichen Intensität zurückgegangen. Der Grund hierfür ist der Stickstoff im Polymer. Durch die Adsorption des Polymers an der Partikeloberfläche wird ein Energietransfer von den Europiumionen zu den Stickstoffionen begünstigt, wodurch die Fluoreszenzintensität vermindert wird.<sup>[57]</sup> Um zu gewährleisten, dass sich die TEOS-Moleküle an die Partikeloberfläche anlagern, wurde der Stöber-Prozess derart modifiziert, dass die Hydrolyse nur in Ethanol durchgeführt wurde. Der geringe Wasseranteil sollte dafür sorgen, dass die Hydrolyse



langsam abläuft und die Moleküle genug Zeit haben, sich an erst an die Partikeloberfläche anzulagern. Es wurden Versuche mit unterschiedlichen Mengen TEOS durchgeführt und jeweils die Fluoreszenzspektren aufgenommen, um die optimale Menge an TEOS herauszufinden.

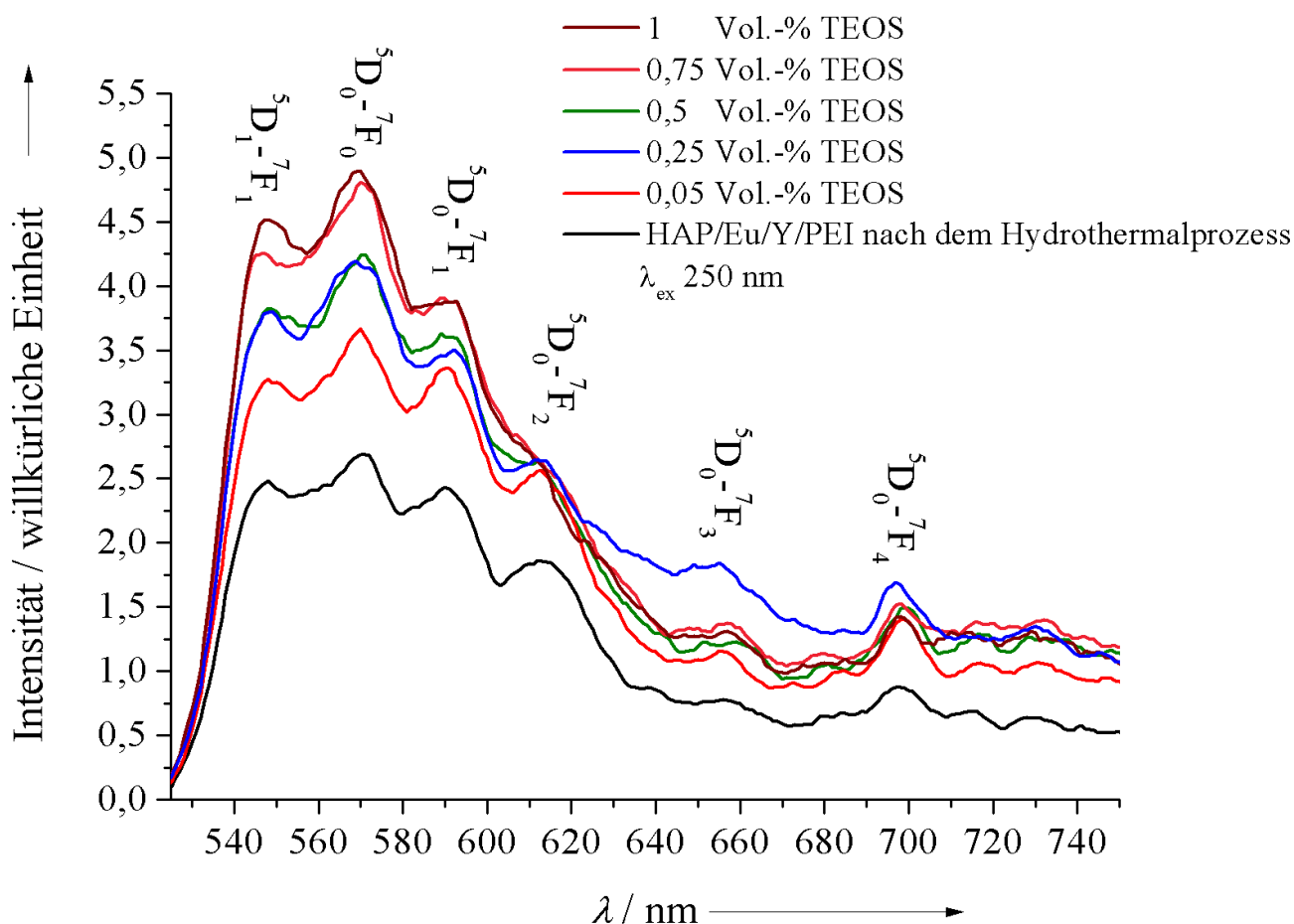


Abbildung 32: Fluoreszenzspektren von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen nach dem Hydrothermalprozess, Funktionalisierung mit PEI und anschließender Zugabe von verschiedenen Mengen an TEOS, gemessen in Dispersion.

In Abbildung 32 sind die Fluoreszenzspektren nach der Zugabe von verschiedenen Mengen an TEOS zu sehen. Schon bei der Zugabe von 0,05 Vol.-% TEOS steigert sich die Fluoreszenzintensität deutlich. Bei Zugabe größerer Mengen TEOS steigert

sich die Fluoreszenzintensität weiter, bei Zugabe von 1 Vol.-% TEOS hat sie sich verdoppelt. Die Spektren deuten darauf hin, dass sich die Partikel durch die langsame Hydrolyse von TEOS erfolgreich mit einer Silikatschicht ummanteln lassen. Durch die Zugabe von größeren Mengen TEOS wird die Schale dicker, so dass die Partikel besser geschützt sind.

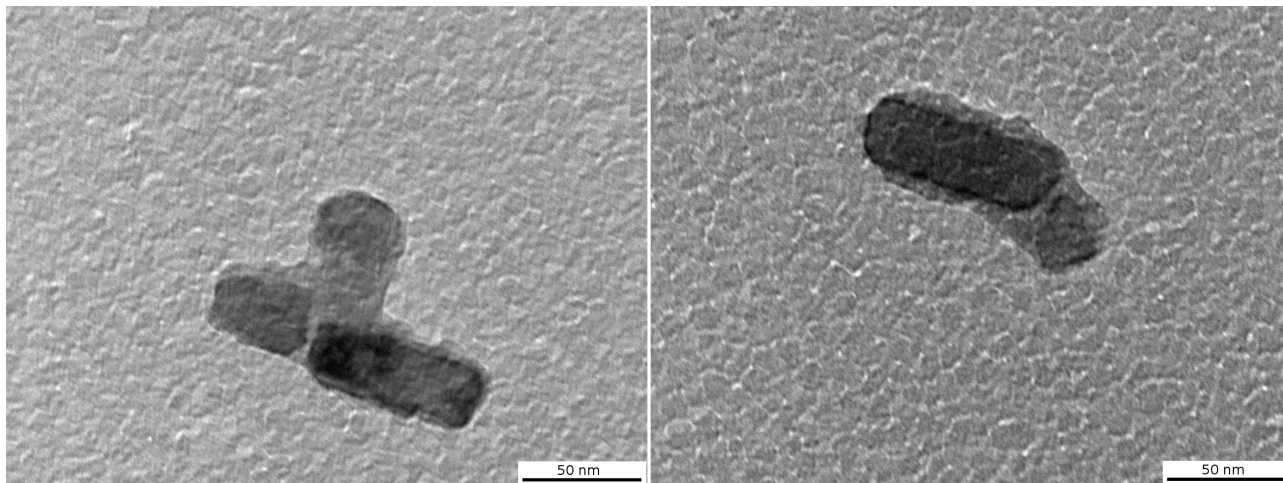


Abbildung 33: TEM-Aufnahmen von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol.-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol.-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen nach dem Hydrothermalprozess, Funktionalisierung mit PEI und nach erfolgter Zugabe von 1 Vol.-% TEOS.

Auf den TEM-Aufnahmen in Abbildung 33 sind die Nanopartikel nach der Zugabe von 1 Vol.-% TEOS zu sehen. Die stäbchenförmigen Hydroxylapatit-Kerne sind aufgrund ihres Kontrastes gut zu erkennen. Um diese Kerne herum kann man noch eine dünne Schicht erkennen, die einen geringeren Kontrast als die Kerne aufweist. Dies deutet auf eine nur wenige Nanometer dicke Silikatschicht hin, die die Hydroxylapatit-Nanopartikel umgibt. Teilweise hat diese Schicht auch mehrere Partikel umschlossen, wie in der rechten Aufnahme zu erkennen ist.

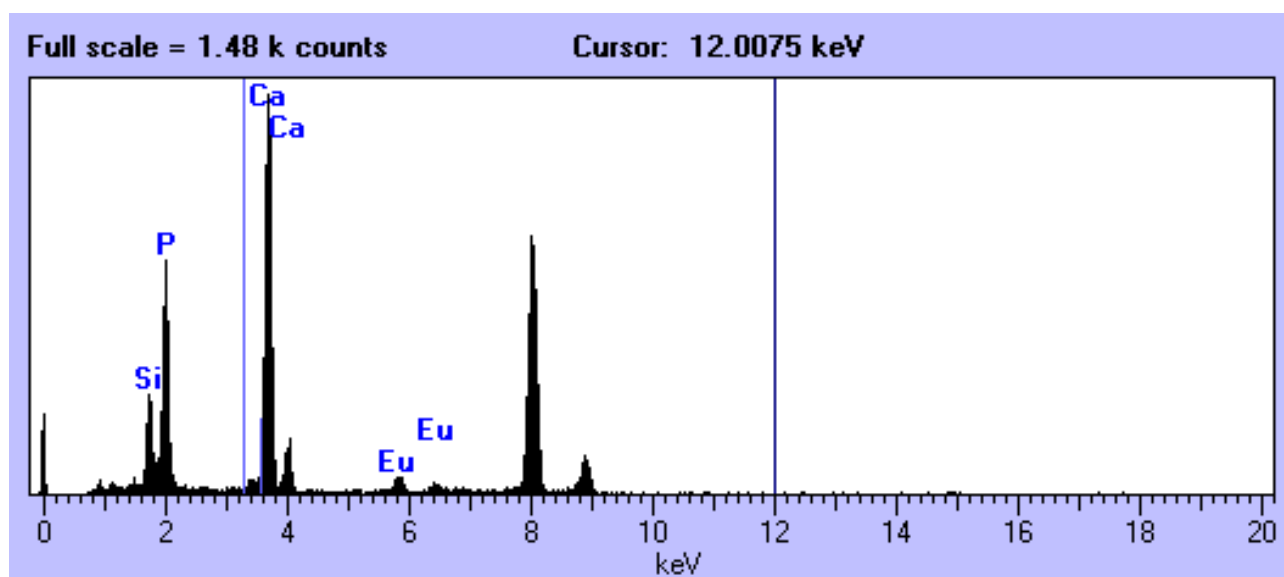


Abbildung 34: EDX-Spektrum von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen nach dem Hydrothermalprozess, Funktionalisierung mit PEI und nach erfolgter Zugabe von 1 Vol.-% TEOS. Der nicht markierte Peak bei 8 keV zeigt das Kupfer des Probenträgers an.

Im EDX-Spektrum in Abbildung 34 sieht man, dass die Hauptbestandteile der Probe Calcium und Phosphor sind. Daneben sind aber auch Europium und Silicium zu erkennen.

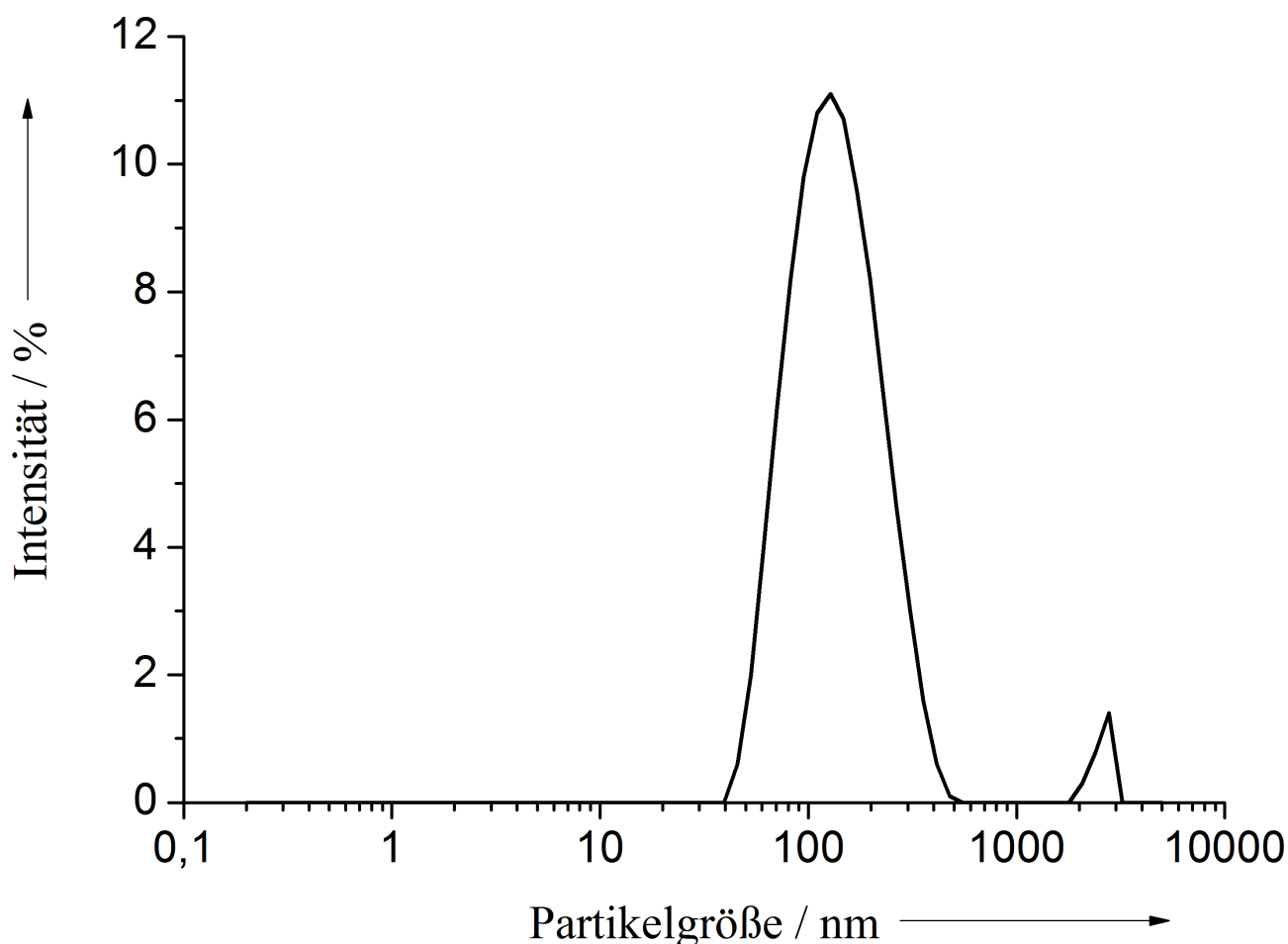


Abbildung 35: DLS-Messung von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen nach dem Hydrothermalprozess, Funktionalisierung mit PEI und nach erfolgter Zugabe von 1 Vol.-% TEOS.

Abbildung 35 zeigt die DLS-Messung der Hydroxylapatit-Nanopartikel nach der Zugabe von 1 Vol.-% TEOS. Die durchschnittliche Größe der Partikel liegt bei 130 nm, die Partikel sind durch die  $\text{SiO}_2$ -Hülle um 23 nm im Durchmesser gewachsen (vgl. Abbildung 28). Der PDI liegt jetzt bei 0,25, die Größenverteilung ist etwas breiter als in Abbildung 28. In der DLS erscheinen die Partikel größer als in den TEM-Aufnahmen, der Größenunterschied lässt sich mit dem hydrodynamischen Radius der Partikel erklären.

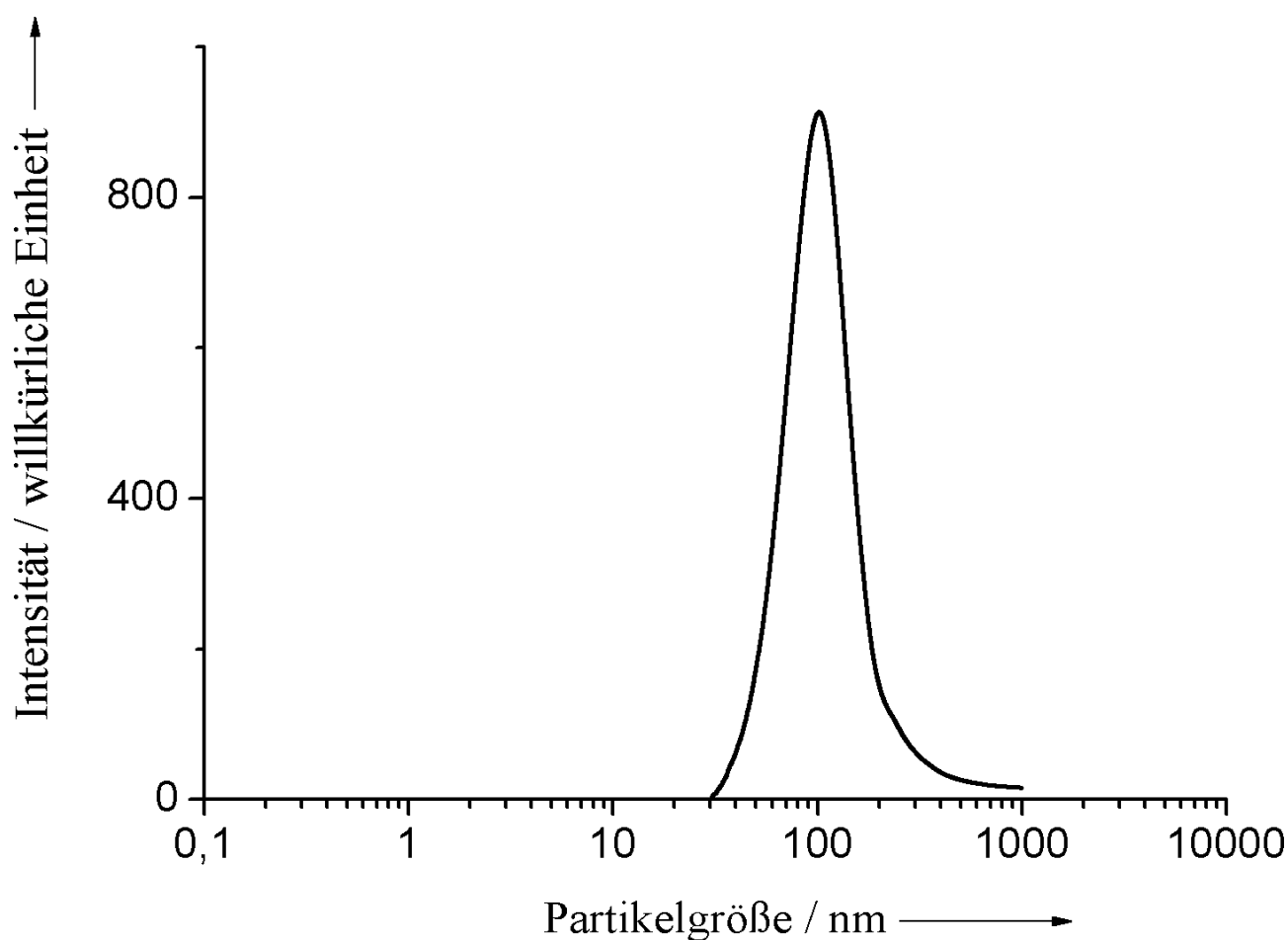


Abbildung 36: Größenbestimmung von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen nach dem Hydrothermalprozess, Funktionalisierung mit PEI und nach erfolgter Zugabe von 1 Vol.-% TEOS mit der Scheibenzentrifuge.

In Abbildung 36 ist die Größenbestimmung der Partikel mit der Scheibenzentrifuge zu sehen. Die durchschnittliche Größe der Partikel liegt bei 100 nm. Obwohl man mit der Scheibenzentrifuge auch den hydrodynamischen Radius misst, erscheinen die Partikel hier deutlich kleiner als in der DLS-Messung. Die in der Scheibenzentrifuge ermittelte Größe stimmt mit der Partikelgröße im TEM überein.

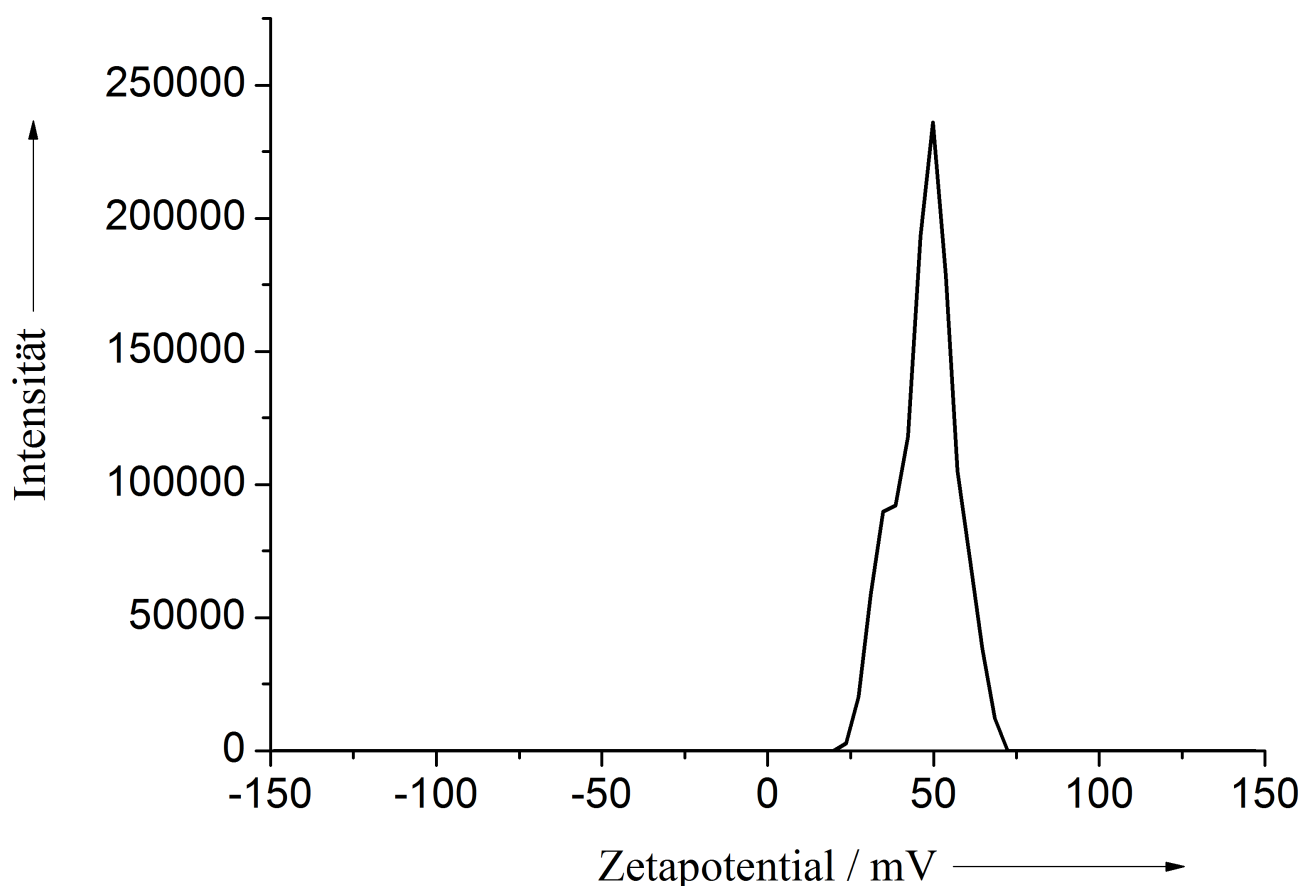


Abbildung 37: Zetapotential von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen nach dem Hydrothermalprozess, Funktionalisierung mit PEI und nach erfolgter Zugabe von 1 Vol.-% TEOS.

Das Zetapotential liegt nach der Zugabe von 1 Vol.-% TEOS bei +48 mV (Abbildung 37). Wären die Partikel komplett mit  $\text{SiO}_2$  umhüllt, so würde man aufgrund von ionisierten Silanolgruppen ein negatives Zetapotential erwarten.[58] Das positive Zetapotential deutet darauf hin, dass das PEI durch die  $\text{SiO}_2$ -Hülle dringt und die Partikel so immer noch eine positive Oberflächenladung aufweisen.

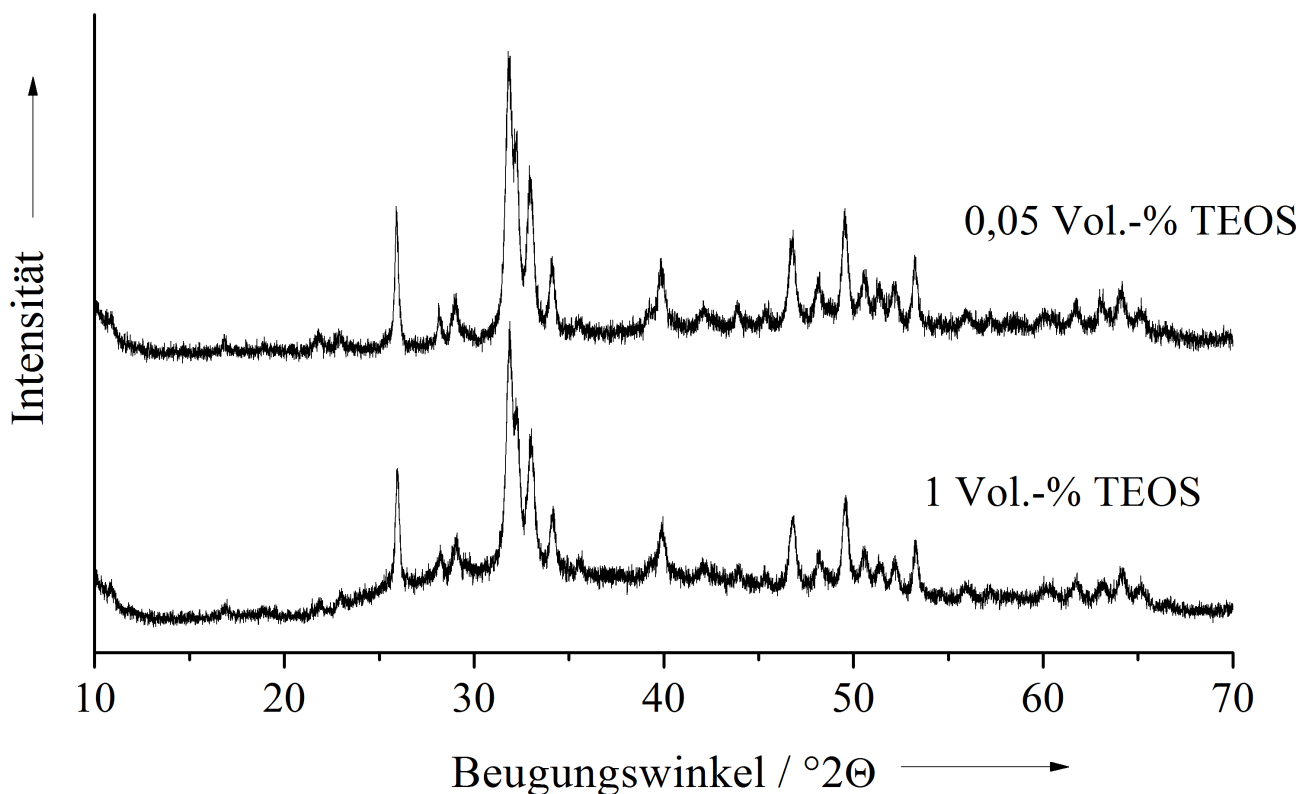


Abbildung 38: Vergleich der Pulverdiffraktogramme von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen nach dem Hydrothermalprozess, Funktionalisierung mit PEI und nach erfolgter Zugabe von 0,05 Vol.-% (oberes Diffraktogramm), bzw. 1 Vol.-% (unteres Diffraktogramm) TEOS. Als Trägermaterial wurde ein Si-Einkristall verwendet.

Die beiden Pulverdiffraktogramme in Abbildung 38 zeigen auch nach der Zugabe von TEOS stets Hydroxylapatit als einzige Phase. Nach der Zugabe von 1 Vol.-% TEOS zeigt sich im Diffraktogramm eine breite Erhöhung der Basislinie im Bereich von 20 °2Θ bis 45 °2Θ. Dies spricht für die Anwesenheit einer amorphen Substanz in der Probe, also für die erfolgreiche Ummantelung der Hydroxylapatit-Nanopartikel mit einer amorphen Silikatschale. Bei der Zugabe von 0,05 Vol.-% TEOS ist diese Schale zu dünn, als dass man sie im Pulverdiffraktogramm erkennen könnte.

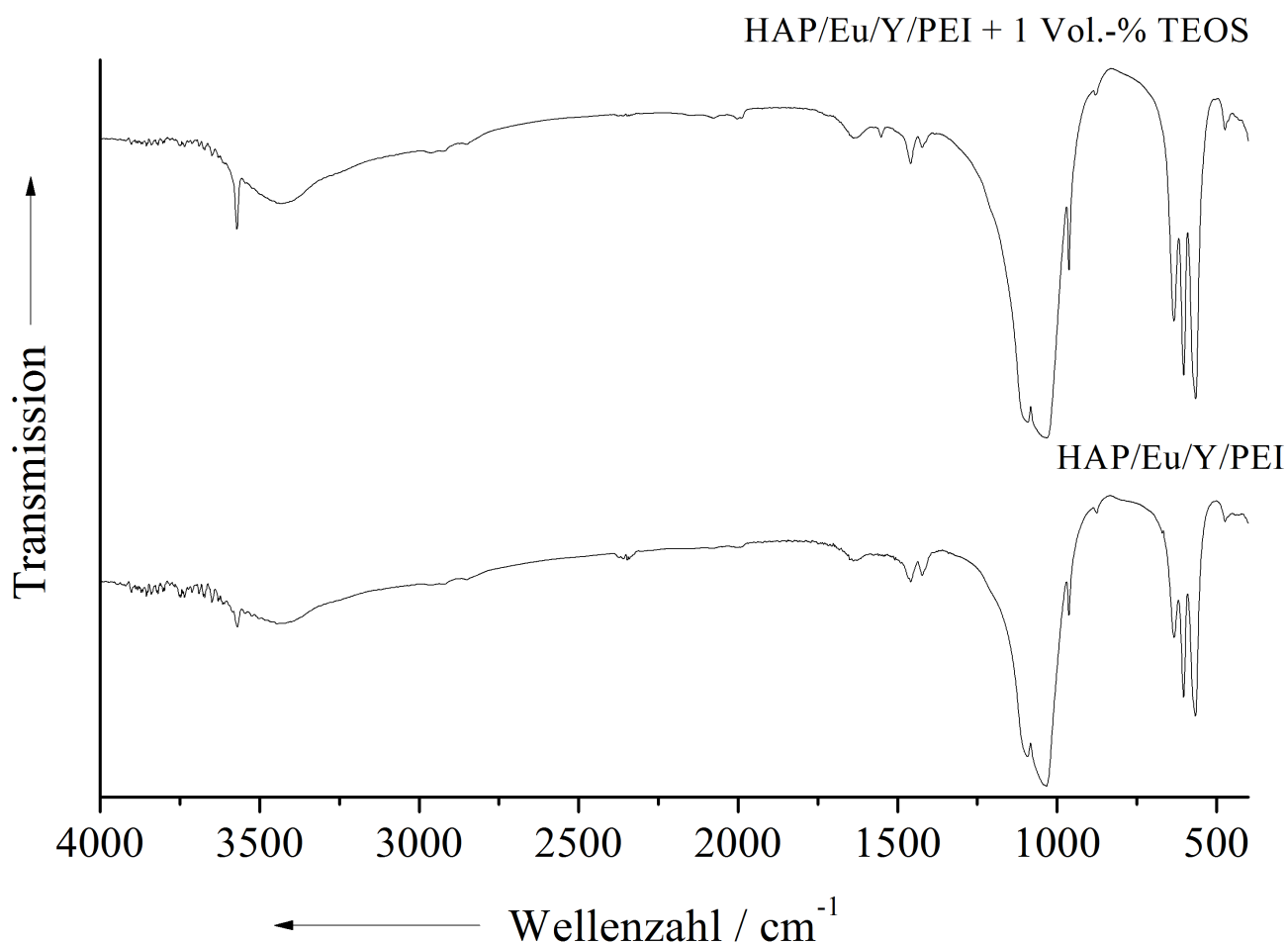


Abbildung 39: IR-Spektren von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen nach dem Hydrothermalprozess, Funktionalisierung mit PEI (unteres Spektrum) und anschließender Zugabe von 1 Vol.-% TEOS (oberes Spektrum).



Tabelle 3: Banden und Zuordnung der IR-Spektren

Wellenzahl [ $\text{cm}^{-1}$ ] gefunden	Wellenzahl [ $\text{cm}^{-1}$ ] Literatur	Gruppe, Schwingungsmodus
3572	3650 <sup>[59]</sup>	O-H, Streckschwingung
879	1125, 870 <sup>[59]</sup>	P-O(H), Streckschwingung
1092, 1030	1090, 1030 <sup>[59]</sup>	P-O, $\nu_3$ antisymmetrische Streckschwingung
603, 564	605, 563 <sup>[59]</sup>	O-P-O, $\nu_4$ Deformationsschwingung
963, 472	962, 470 <sup>[59]</sup>	$\nu_1, \nu_2, \text{PO}_4^{3-}$
1459, 1423	1470, 1410 <sup>[59]</sup>	$\nu_3, \text{CO}_3^{2-}$

Der Vergleich der beiden IR-Spektren in Abbildung 39 zeigt ebenfalls keine Unterschiede. Die Banden für die einzelnen O-P-O-Schwingungsmodi ( $\nu_1$ – $\nu_4$ ) sind gut zu erkennen. Auch die Schwingungen der  $\text{CO}_3^{2-}$ - und  $\text{HPO}_4^{2-}$ -Gruppen sind zu erkennen. Die Banden sind schmal, was auch auf die hohe Kristallinität des Materials hindeutet. Zudem sind auch noch sehr schwache Banden der C-H-Valenzschwingungen zu erkennen, die vom adsorbierten PEI stammen. Die intensivste Bande von  $\text{SiO}_2$  wäre bei  $500 \text{ cm}^{-1}$  zu finden. In diesem Bereich ist keine Bande im IR-Spektrum zu erkennen, was auf einen sehr geringen Anteil an  $\text{SiO}_2$  in der Probe hindeutet.

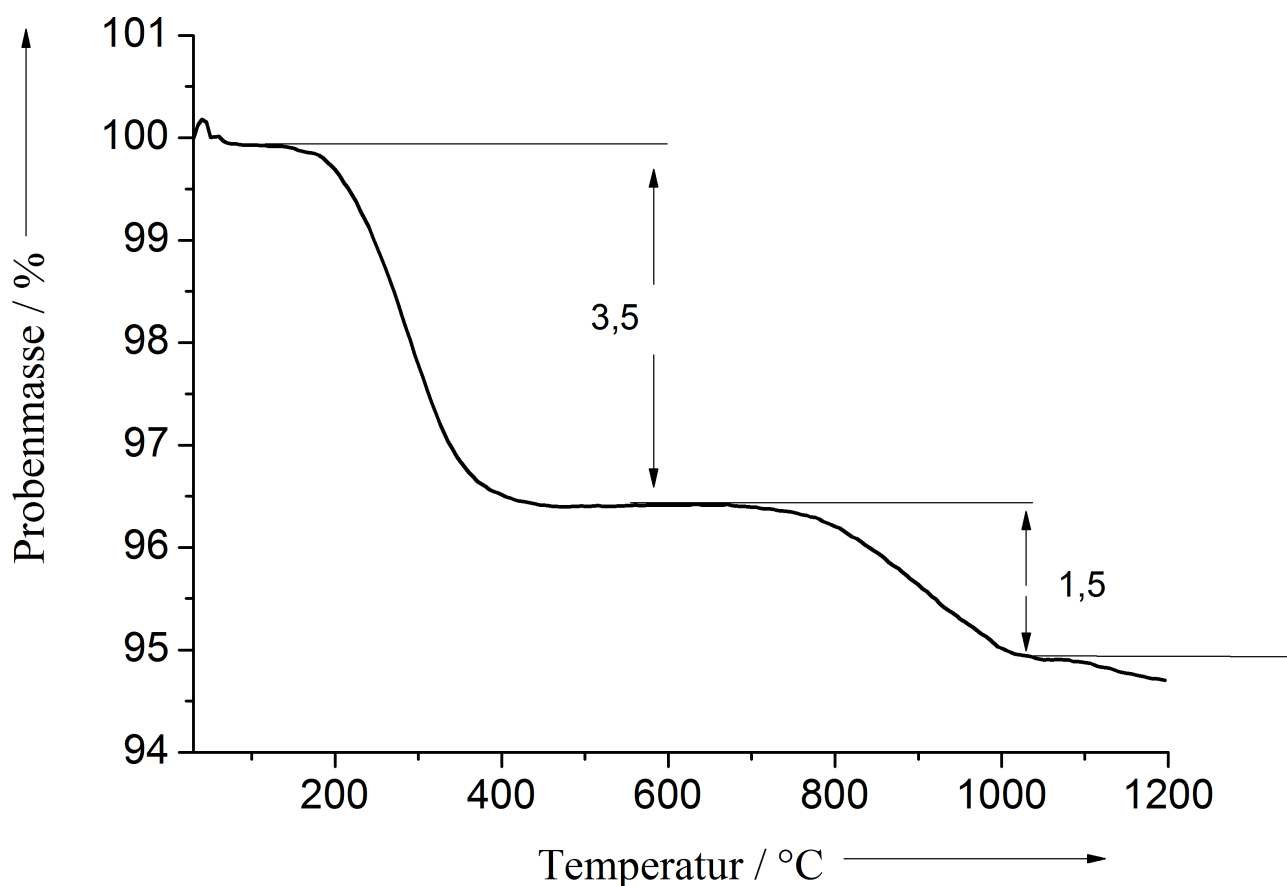


Abbildung 40: Thermogramm von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen nach dem Hydrothermalprozess, Funktionalisierung mit PEI und nach erfolgter Zugabe von 1 Vol.-% TEOS, gemessen in einer Sauerstoffatmosphäre ( $50 \text{ mL min}^{-1}$ ) mit einer Heizrate von  $1 \text{ K min}^{-1}$ .

Das Thermogramm in Abbildung 40 zeigt nur geringe Unterschiede zu dem Thermogramm, das vor der Zugabe von TEOS aufgenommen wurde (Abbildung 30). Die Restmasse ist in beiden Thermogrammen fast identisch, so dass wahrscheinlich nur wenig Silikat an der Partikeloberfläche kondensiert ist. Die Ergebnisse werden durch die Elementaranalyse bestätigt.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4: Ergebnisse der Elementaranalyse und der daraus berechneter Anteil an der Gesamtprobe für Hydroxylapatit-Nanopartikel, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen nach dem Hydrothermalprozess, Funktionalisierung mit PEI und nach erfolgter Zugabe von 1 Vol.-% TEOS.

Element	Gefunden		Anteil an Gesamtprobe
$\text{Ca}^{2+}$	$(36,00 \pm 0,30) \%$	Hydroxylapatit	90,3 % (Mittelwert aus den über die $\text{Ca}^{2+}$ - und $\text{PO}_4^{3-}$ -Mengen berechneten Anteilen)
$\text{PO}_4^{3-}$	$(51,20 \pm 0,42) \%$		
$\text{Eu}^{3+}$	$(2,70 \pm 0,04) \%$		1,8 %
N	$(1,20 \pm 0,01) \%$	PEI	3,9 %
C	$(2,60 \pm 0,02) \%$	$\text{CO}_3^{2-}$	1,8 % (Der Kohlenstoffgehalt des Polymers wurde abgezogen)
		$\text{SiO}_2$	2-3 %

Wie erwartet, macht Calciumphosphat den Hauptanteil der Probe aus. Das zugegebene Europium ist fast vollständig in die Nanopartikel eingebaut worden. Die Ergebnisse der Elementaranalyse stimmen gut mit den Ergebnissen der Thermoanalyse überein. Der Anteil des Polymers wurde aus der gefundenen Menge Stickstoff berechnet, da dies das einzige stickstoffhaltige Molekül in der Probe ist. Mit dem Polymeranteil wurde anschließend der Kohlenstoffgehalt berechnet und von dem ermittelten Kohlenstoffanteil abgezogen. Der restliche Kohlenstoff ist auf Carbonationen zurückzuführen, die während der Synthese eingebaut wurden. Der Anteil des Silikats wurde

dann aus der Differenz zu hundert Prozent Gesamtmasse berechnet.

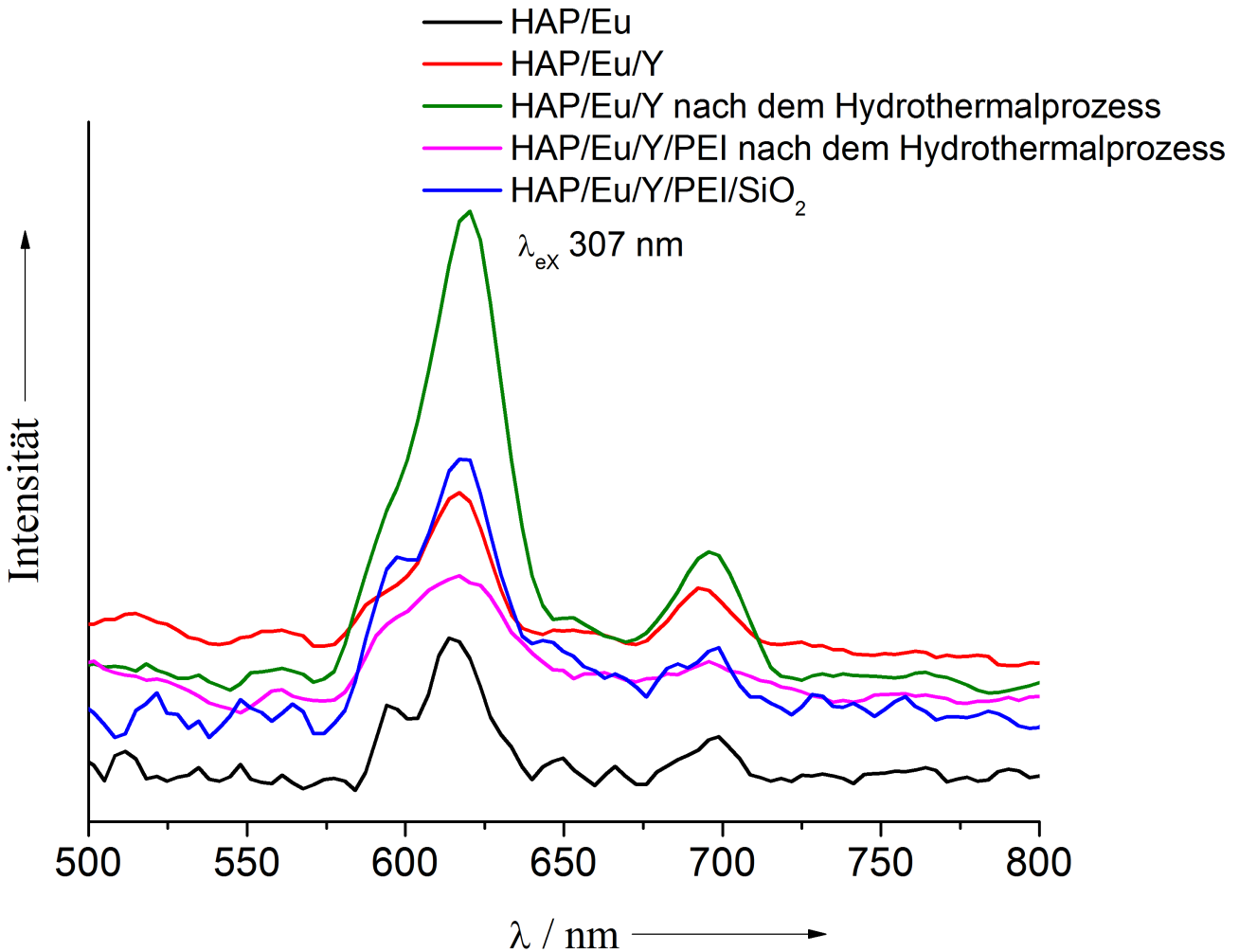


Abbildung 41: Fluoreszenzspektren von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, ausschließlich mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen dotiert, mit 2 mol-%  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen co-dotiert, vor und nach dem Hydrothermalprozess, mit PEI funktionalisiert und mit  $\text{SiO}_2$  umhüllt. Alle Proben wurden als Feststoff gemessen.

In Abbildung 41 ist die Veränderung der Fluoreszenzintensität durch die einzelnen Modifikationen an den nur mit Europium dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikeln zu erkennen. Durch die Co-Dotierung mit Yttrium und die Erhöhung der Kristallinität ergibt sich insgesamt eine sechsmal stärkere Fluoreszenzintensität. Durch die Funktionalisierung mit PEI fällt die Fluoreszenzintensität dann wieder stark ab, so dass die

Fluoreszenzintensität nur noch fast zweimal stärker ist als zu Beginn. Die Ummantelung mit  $\text{SiO}_2$  erhöht die Fluoreszenzintensität dann wieder, so dass letztendlich eine dreimal höhere Fluoreszenzintensität, verglichen mit den nur mit Europium dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikeln, erreicht wird.

Da die Fluoreszenzintensität der mit Terbium und Cer co-dotierten nach dem Hydrothermalprozess geringer ist als vorher, wurden für die Ummantelung mit einer  $\text{SiO}_2$ -Hülle die Partikel direkt nach der Synthese zunächst mit PEI funktionalisiert, in Ethanol redispergiert und mit TEOS versetzt.

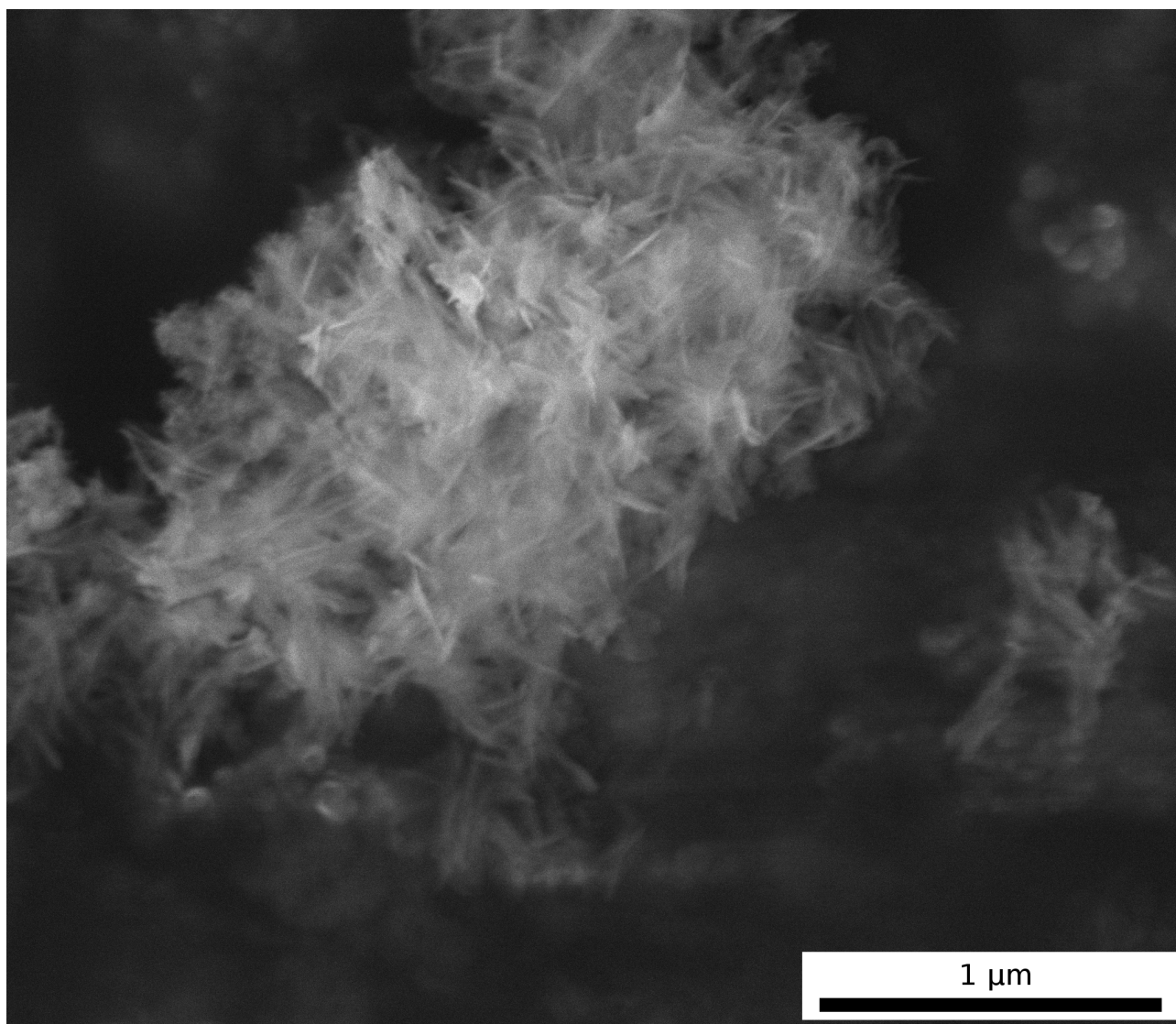


Abbildung 42: REM-Aufnahme von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Tb}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Ce}^{3+}$ -Ionen nach Zugabe von 1 Vol.-% TEOS.

In der REM-Aufnahme ist nach der Ummantelung mit einer Silikatschale kein Unterschied in der Partikelgröße oder -morphologie zu erkennen. Es sind jedoch auch sphärische Partikel in der REM-Aufnahme zu sehen. Diese deuten auf eine Bildung von  $\text{SiO}_2$ -Nanopartikeln aus überschüssigem TEOS hin.

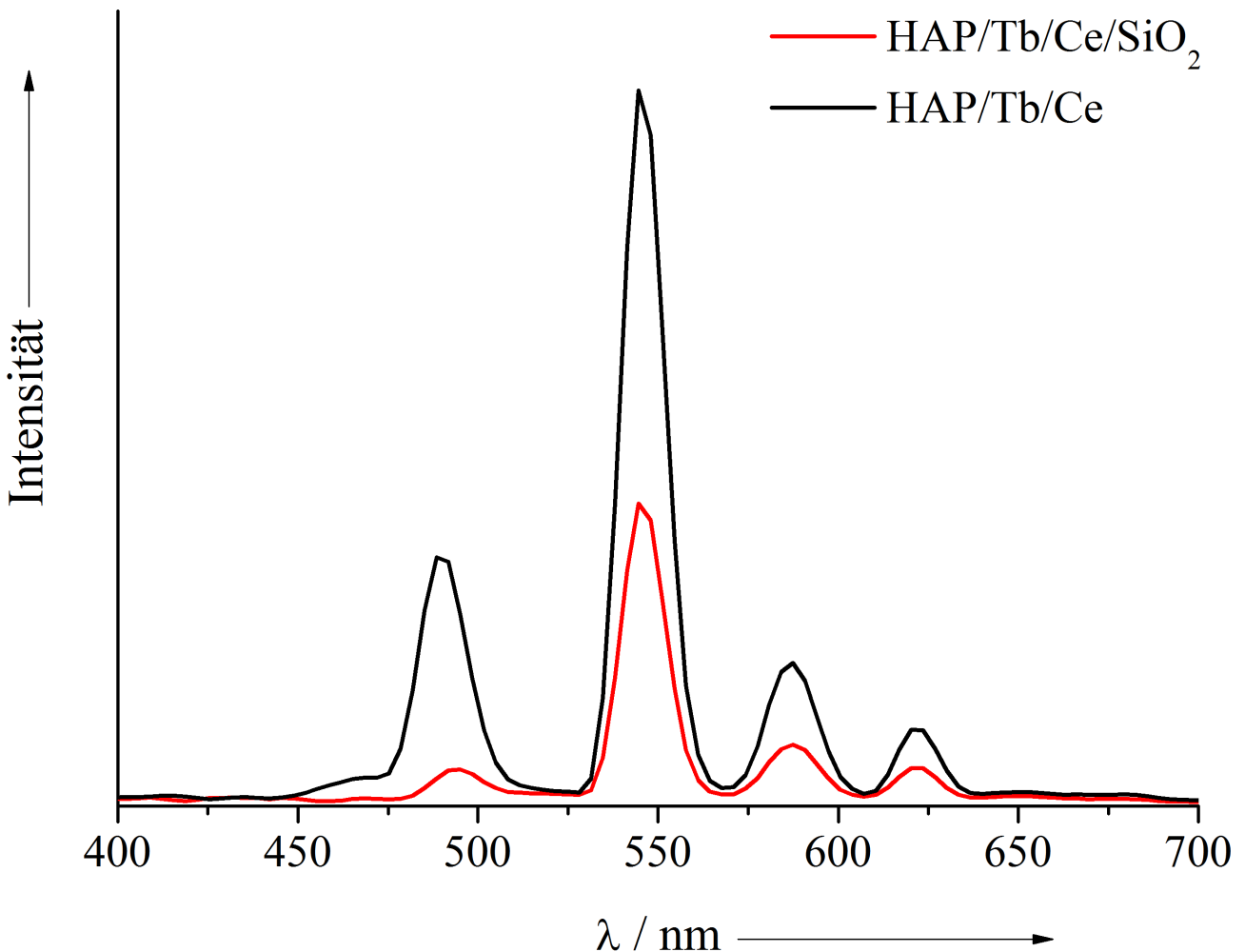


Abbildung 43: Fluoreszenzspektren von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Tb}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Ce}^{3+}$ -Ionen nach der Synthese (schwarze Kurve) und nach Zugabe von 1 Vol.-% TEOS (rote Kurve), gemessen als Feststoff mit einer Anregungswellenlänge von 306nm.

Auch durch die Ummantelung mit der Silikatschale wurde die Fluoreszenzintensität der mit Terbium und Cer co-dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikel verringert. Aller-

dings ist die Fluoreszenzintensität durch die Silikatschale nur um die Hälfte verringert worden.

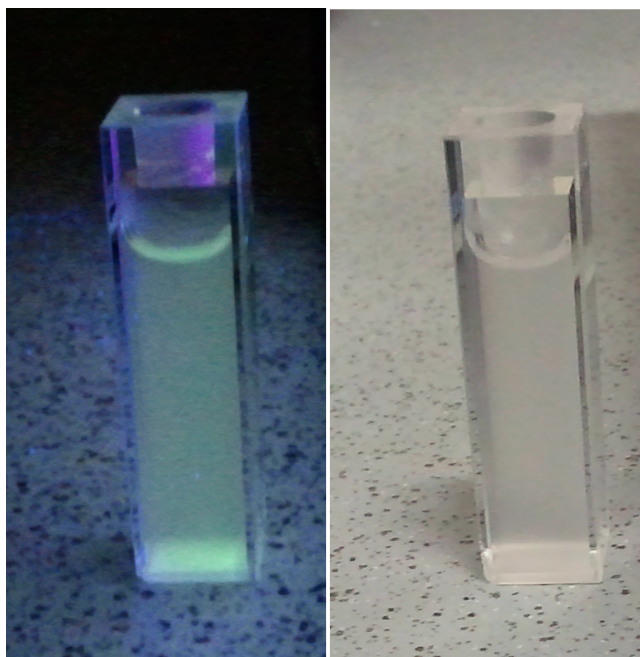


Abbildung 44: Dispersion von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Tb}^{3+}$ -Ionen und 0,5 mol-%  $\text{Ce}^{3+}$ -Ionen nach Zugabe von 1 Vol.-% TEOS unter UV-Licht (254 nm, linkes Bild) und normaler Beleuchtung (rechtes Bild).

Obwohl die Fluoreszenzintensität durch die Ummantelung mit einer Silikatschale sinkt, ist die Fluoreszenz noch stark genug, um eine Dispersion mit geringer Konzentration ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zu illuminieren. Die Dispersion ist allerdings nicht stabil, schon nach wenigen Minuten flocken Partikelaggregate aus.

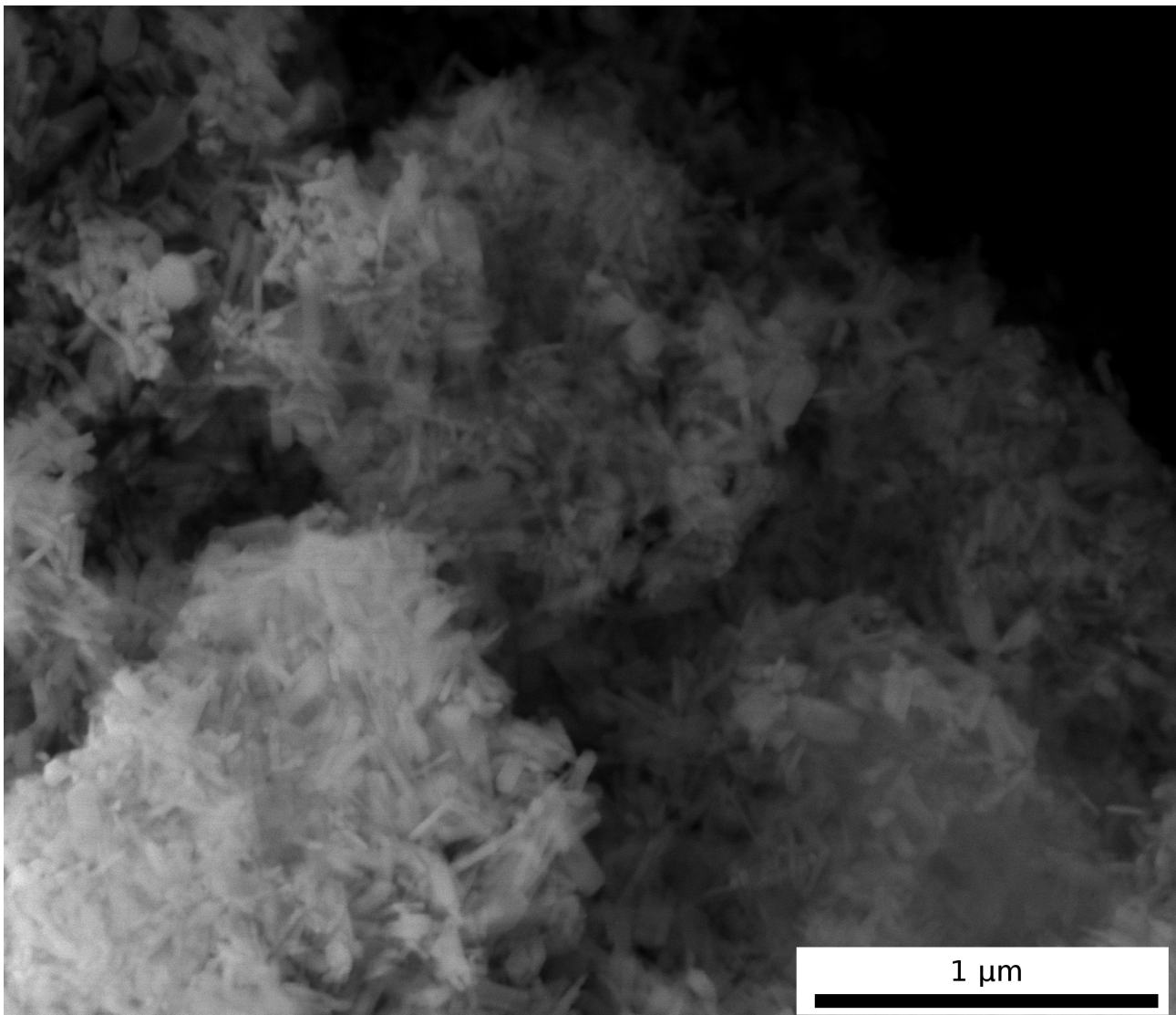


Abbildung 45: REM-Aufnahme von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Dy}^{3+}$ -Ionen und 1 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen nach dem Hydrothermalprozess und nach Zugabe von 1 Vol.-% TEOS.

Auch die Dysprosium und Ytrium co-dotierten Nanopartikel zeigen keine Änderungen in Größe oder Gestalt nach der Ummantelung mit einer  $\text{SiO}_2$ -Schale.



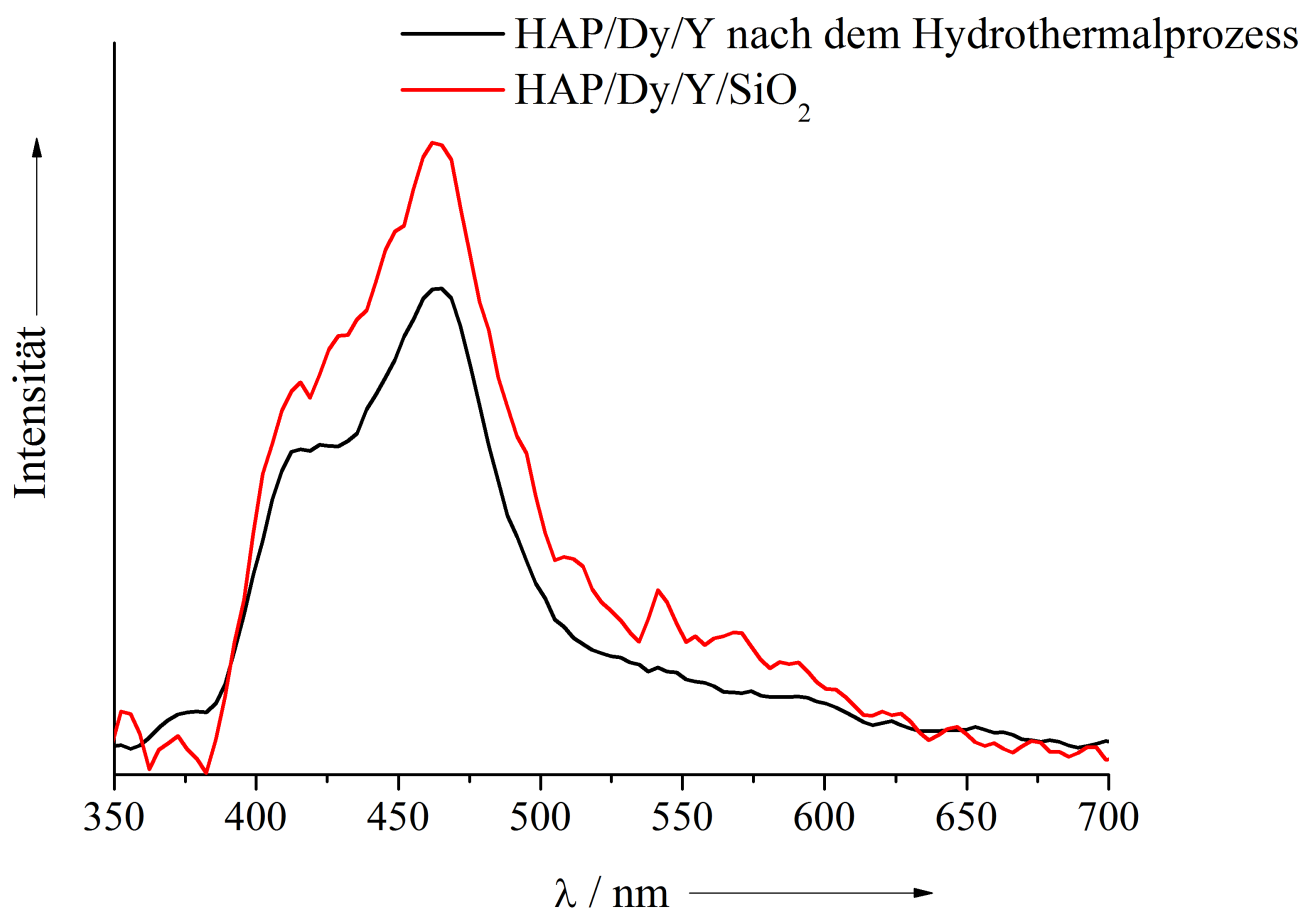


Abbildung 46: Fluoreszenzspektren von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Dy}^{3+}$ -Ionen und 1 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen nach dem Hydrothermalprozess (schwarze Kurve) und nach Zugabe von 1 Vol.-% TEOS, gemessen als Feststoff bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm.

Nach der Ummantelung mit einer  $\text{SiO}_2$ -Schale steigt die Fluoreszenzintensität des  $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^6\text{H}_{15/2}$ -Übergangs lediglich um 15 %.

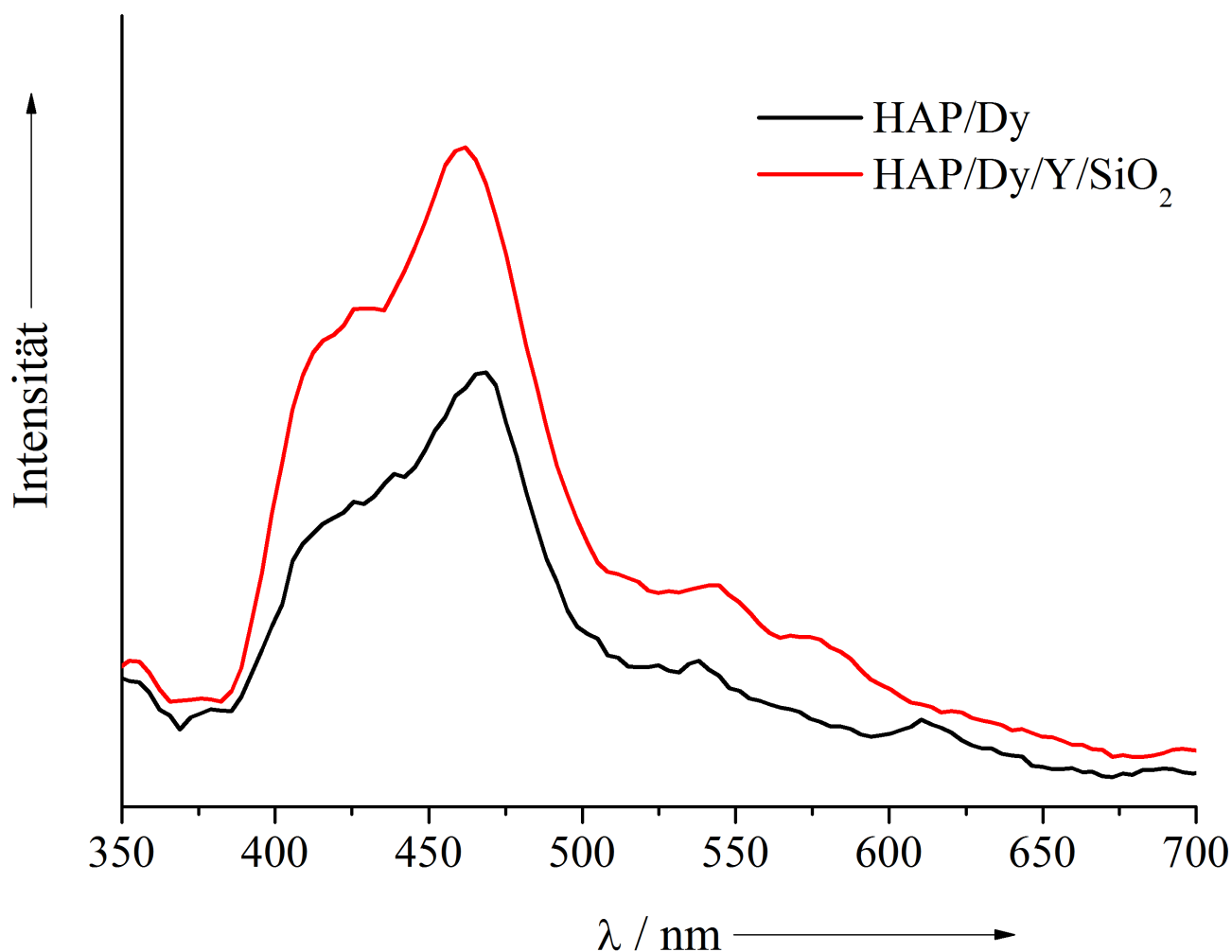


Abbildung 47: Vergleich der Fluoreszenzspektren von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, dotiert mit 2 mol-%  $\text{Dy}^{3+}$ -Ionen (schwarze Kurve) und co-dotiert mit 2 mol-%  $\text{Dy}^{3+}$ -Ionen und 1 mol-%  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen, nach dem Hydrothermalprozess und nach Zugabe von 1 Vol.-% TEOS (rote Kurve), gemessen als Feststoff mit einer Anregungswellenlänge von 295 nm.

Insgesamt ergibt sich für die mit einer  $\text{SiO}_2$ -Schale ummantelten Partikel eine 50 %ige Steigerung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den nur mit Dysprosium dotierten Partikeln.

### 4.1.8. Zusammenfassung

Durch die Dotierung von Hydroxylapatit-Nanopartikeln mit Lanthanoid-Ionen lassen sich biokompatible fluoreszierende Nanopartikel darstellen. Da die Fluoreszenz durch Elektronenübergänge zwischen den f-Orbitalen der Lanthanoid-Ionen entsteht, sind die Partikel photostabil und ermöglichen so Langzeituntersuchungen in lebenden Organismen, die mit organischen Fluoreszenzfarbstoffen nicht möglich wären.

Allerdings ist die Fluoreszenzintensität von Lanthanoid-dotierten Nanopartikeln im Vergleich zur Volumenphase deutlich verringert. Zum einen findet aufgrund der geringeren Kristallinität der Nanopartikel kein effektiver Energietransfer zu den Lanthanoid-Ionen statt. Zum anderen befinden sich durch die große spezifische Oberfläche viele Lanthanoid-Ionen ebenfalls an der Oberfläche, so dass diese nicht effektiv von allen Seiten Energie aufnehmen können, wie Lanthanoid-Ionen im Innern der Nanopartikel. Außerdem unterliegen die Oberflächen-Lanthanoid-Ionen unterschiedlichen Quenchingeinflüssen, z. B. durch das umgebende Lösungsmittel.

Durch die Co-Dotierung mit einem geeigneten Sensibilisator kann die Fluoreszenzintensität erhöht werden. Durch die Erhöhung der Kristallinität der Nanopartikel kann der Energietransfer verbessert werden, da sich bei höherer Kristallinität weniger Defekte im Kristallgitter befinden. Eine erhöhte Kristallinität erhält man oft auf Kosten der Partikelgröße, d. h., dass die Nanopartikel zu größeren Partikeln heranreifen, während die Kristallinität erhöht wird.

Durch einen Hydrothermalprozess konnte bei einem geringen Partikelwachstum die Kristallinität deutlich erhöht werden. Dadurch konnte die Fluoreszenzintensität bei den mit Europium und Yttrium co-dotierten Partikeln noch mal erhöht werden, so dass diese verglichen mit den ausschließlich mit Europium dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikeln sechsmal höher war. Bei den mit Terbium dotierten Partikeln hatte die Erhöhung der Kristallinität einen negativen Effekt. Hier ist die direkte Absorption von co-dotierten Cerionen sehr effektiv. Die direkte Absorption wird durch das Parti-

kelwachstum beim Hydrothermalprozess abgeschirmt, so dass die Fluoreszenzintensität sinkt.

Durch das Aufbringen einer Schale kann die Fluoreszenzintensität noch weiter erhöht werden, da dann auch Quenchingeinflüsse an der Oberfläche minimiert werden könnten. Über eine Modifikation des Stöber-Prozesses wurde versucht, die Partikel mit einer  $\text{SiO}_2$ -Schale zu umhüllen. Um die Kondensation der TEOS-Moleküle auf der Partikeloberfläche zu gewährleisten, wurden die Partikel zunächst mit PEI funktionalisiert. Die Aminogruppen im Polymer wirken allerdings als Quencher, so dass die Fluoreszenzintensität stark reduziert wird. Durch das Aufbringen der  $\text{SiO}_2$ -Schale kann die Intensität wieder erhöht werden; sie ist aber dann immer noch niedriger als die Fluoreszenzintensität vor der Funktionalisierung mit PEI. Durch die Wahl eines anderen kationischen Polymers kann die Fluoreszenzintensität möglicherweise noch stark erhöht werden, allerdings darf das Polymer dann keinen Stickstoff enthalten und sollte für Anwendungen im biomedizinischen Bereich nicht toxisch sein.

Eine Ummantelung der Partikel ohne vorherige Funktionalisierung mit einem Polymer ist nicht möglich, da die Kondensation der Silane nur langsam verläuft. In dieser Zeit aggregieren die Partikel, so dass nur größere Aggregate mit einer Silikatschicht umhüllt werden.

### 4.2. Stabilität von Calciumphosphat-DNA-Nanopartikeln

Um Gendefekte oder Erbkrankheiten zu bekämpfen, ist es nötig, fremde DNA oder RNA in Zellen einzuschleusen. Hierfür gibt es unterschiedliche Methoden; die Transfektion und die Transduktion, die mit viralen Vektoren arbeitet. Bei den viralen Vektoren werden Retroviren und Adenoviren verwendet.<sup>[60-66]</sup> Die Transduktion ist gegenüber der Transfektion wesentlich effizienter, birgt aber auch höhere Risiken, wie eine Tumorbildung.<sup>[66, 67]</sup>

Die Transfektion wird in chemische und physikalische Methoden unterteilt. Zu den chemischen Methoden zählen die Verwendung anorganischer Nanopartikel, die Lipofektion und die Verwendung kationischer Polymere.<sup>[68-71]</sup> Daneben gibt es dann noch physikalische Methoden, wie die *gene gun*,<sup>[72-74]</sup> wobei die Zellen mit Goldpartikeln beschossen werden, die mit einer entsprechenden DNA funktionalisiert sind. Zudem werden noch die direkte Mikroinjektion der DNA in die Zellen und die Elektroporation, bei der die Zellwand durch Spannungspulse für DNA durchlässig gemacht wird, verwendet.<sup>[75]</sup>

Alle nicht-viralen Methoden sind weniger effizient als die Verwendung viraler Vektoren, werden aber aufgrund des Risikos der Rekombination, der Kanzerogenität und der Beschränkung auf sich teilende Zelllinien<sup>[71]</sup> bei viralen Vektoren diesen vorgezogen. Vor allem bei den chemischen Transfektionsmethoden ist aber auch die Toxizität des DNA-Trägers zu beachten. So kann PEI als kationisches Polymer die DNA effizient binden und in die Zelle transportieren. Während die Effizienz mit dem Molekulargewicht und dem Verzweigungsgrad des Polymers steigt, so wird ebenso die Zytotoxizität erhöht.<sup>[68, 76, 77]</sup> Auch die Verwendung anorganischer Nanopartikel als Träger für DNA zeigt nur geringe Transfektionseffizienzen, und es muss auch hier eine mögliche Toxizität des Trägermaterials berücksichtigt werden.

Besonders Calciumphosphat-Nanopartikel werden als DNA-Trägermaterial untersucht,<sup>[78-81]</sup> da Calciumphosphat aufgrund seiner Biokompatibilität als Trägermaterial

für Nukleinsäuren gut geeignet ist.<sup>[82-84]</sup> Zudem wird eine Funktionalisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln auch durch die hohe Affinität von Nukleinsäuren zu den zweiwertigen Kationen der Erdalkalimetalle begünstigt.<sup>[78]</sup> Die Verwendung von Calciumphosphat-Nanopartikeln ist eine Weiterentwicklung der Calciumphosphat-Präzipitation, einer Standardmethode für die Transfektion. Bei dieser Methode wird Calciumphosphat aus Calciumchlorid und Natriumphosphat in Gegenwart einer Nukleinsäure gefällt. Die resultierenden Partikel werden dann zu einer Zellkultur gegeben, wo sie durch Endocytose von den Zellen aufgenommen werden und so die Nukleinsäure in die Zellen transportieren können.<sup>[78, 85]</sup> Diese Methode hat allerdings den Nachteil, dass die gefällten Calciumphosphat-Partikel stark in ihrer Größe variieren können, was auch starke Variationen in der Transfektionseffizienz nach sich zieht. Durch die Verwendung von Calciumphosphat-Nanopartikeln als Träger können diese Größenvariationen minimiert werden und die Partikel somit besser von den Zellen aufgenommen werden.<sup>[70, 86]</sup> Auch eine mögliche Akkumulation der Nanopartikel innerhalb der Zelle stellt keine Gefahr dar, da sich diese im sauren Cytoplasma auflösen und die Ionen die Zelle letztendlich wieder über die Ionenkanäle verlassen.<sup>[87]</sup>

### 4.2.1. Experimenteller Teil

Eine 6 mM Calcium-*L*-lactat-Lösung und eine 3,6 mM *di*-Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung werden auf einen pH-Wert von 9 eingestellt.

Für die Untersuchung der Adsorptionskinetik werden jeweils 0,5 mL der beiden Lösungen mit 200 µL DNA-Lösung (1 mg mL<sup>-1</sup>, DNA aus Lachshoden, 2000 Basenpaare) gemischt und nach unterschiedlichen Zeiträumen untersucht. Für die DNA-Quantifizierung wird die Dispersion mit 151000 g abzentrifugiert. Die DNA-Konzentration im Überstand wird mit dem Farbstoff PicoGreen® bestimmt. Als Referenz wird ebenfalls DNA aus Lachshoden verwendet, deren Konzentration zuvor über ein Absorptionsspektrum bestimmt wurde. Dabei wird die Absorption bei 260 nm betrachtet. Hier

entspricht eine Absorption von 1 der Konzentration  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  DNA.<sup>[88]</sup>

Für die Quantifizierung der an der Partikeloberfläche adsorbierten DNA werden jeweils 0,5 mL der Calcium-*L*-lactat-Lösung und der *di*-Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung mit unterschiedlichen Volumina der DNA-Lösung gemischt und die Dispersionen nach 4 h mit  $151000 \text{ g}$  abzentrifugiert. Die DNA-Konzentration im Überstand wird mit dem Farbstoff PicoGreen<sup>®</sup> quantifiziert.

### 4.2.2. Charakterisierung der Calciumphosphat-DNA-Nanopartikel

Da DNA durch eine Ultraschallbehandlung fragmentiert und so deren Funktion zerstört werden kann, ist eine Reinigung von DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln sehr schwierig. Deshalb ist es wichtig, die optimale Menge an DNA zu finden, die benötigt wird, um die Partikel zu stabilisieren.

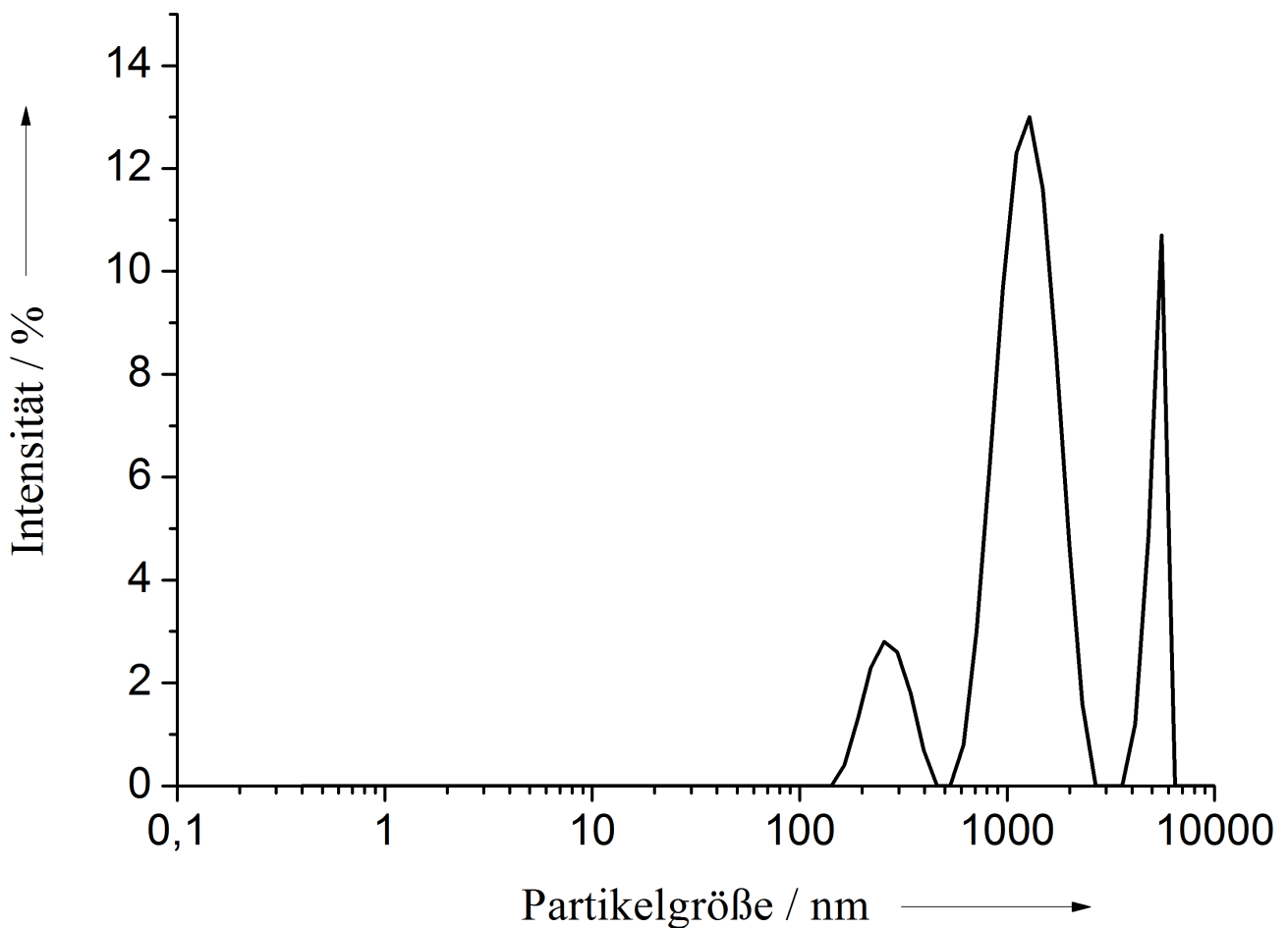


Abbildung 48: DLS-Messung von DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln.

In Abbildung 48 erkennt man, dass die Calciumphosphat-DNA-Nanopartikel keine monodisperse Größenverteilung aufweisen. Neben Partikeln mit einer durchschnittlichen Größe von 255 nm sind auch größere Aggregate mit Größen von 1,3 µm und 5,6 µm zu erkennen.



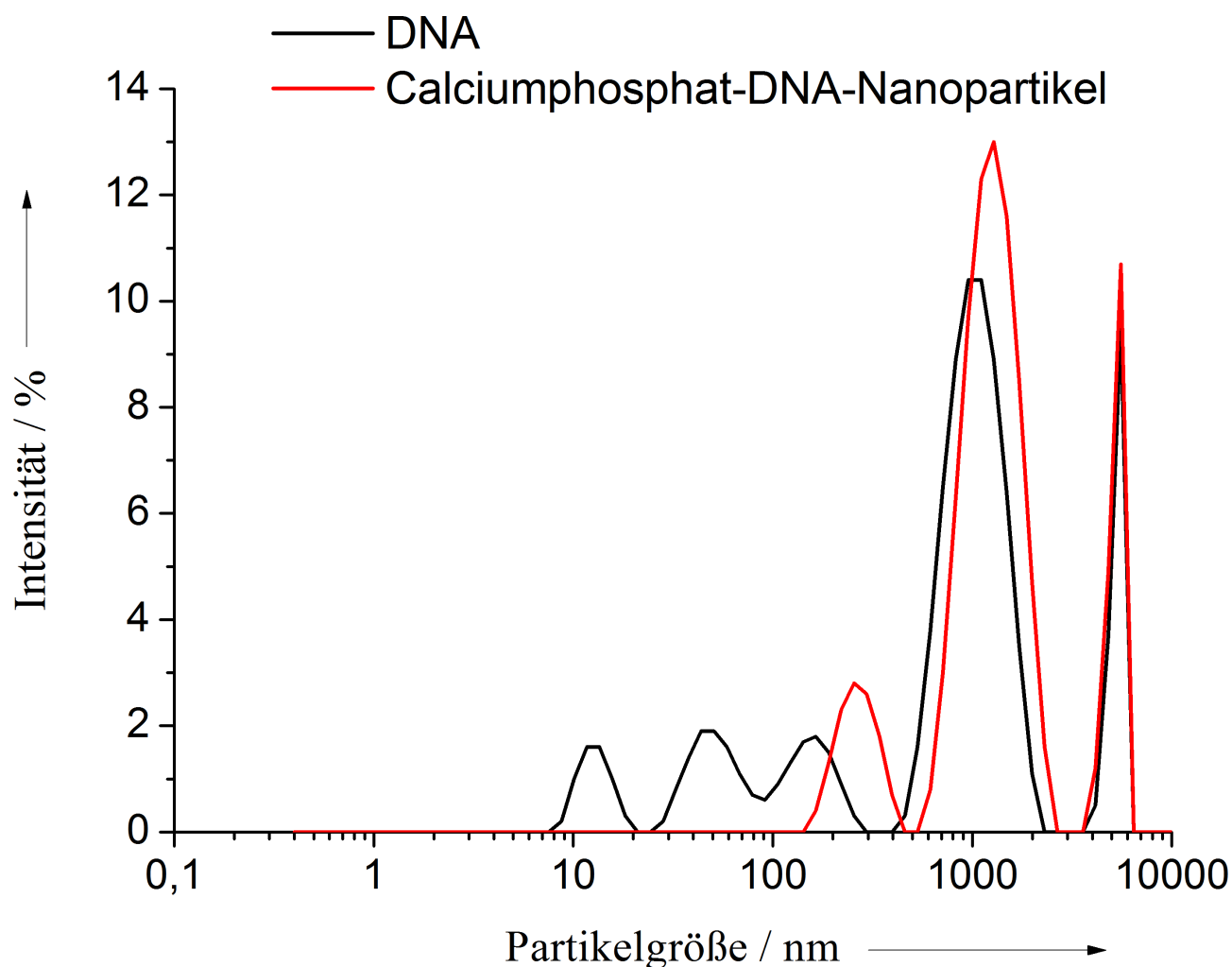


Abbildung 49: Vergleich der DLS-Messungen von Calciumphosphat-DNA-Nanopartikeln (rote Kurve) mit reiner DNA-Lösung ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , schwarze Kurve).

Vergleicht man die Größenbestimmung der Nanopartikel mit einer Messung der verwendeten DNA-Lösung (Abbildung 49), so fällt gerade im  $\mu\text{m}$ -Bereich die Ähnlichkeit der Größenverteilungen auf. Die DNA-Lösung weist Peaks im Bereich unter 100 nm auf, die allerdings auf Messartefakte zurückzuführen sind. Dies deutet darauf hin, dass sich in der Dispersion ein großer Überschuss an DNA befindet, der letztendlich die Messung der Partikelgröße erschwert.

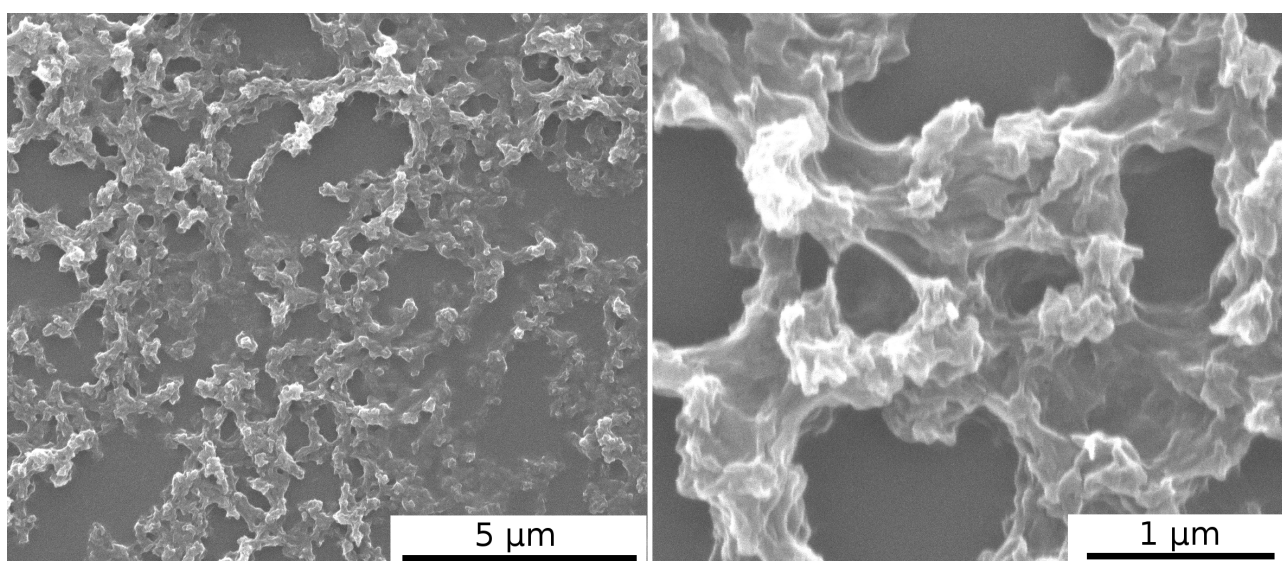


Abbildung 50: REM-Aufnahmen der DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die REM-Aufnahmen in Abbildung 50 zeigen einen Film, der den Großteil der Oberfläche des Silicium-Wafers bedeckt. Dies ist der getrocknete Überschuss DNA, der keine Calciumphosphat-Nanopartikel erkennen lässt.

### 4.2.3. Quantifizierung der an der Partikeloberfläche adsorbierten DNA

Für reproduzierbare Transfektionsergebnisse ist es wichtig zu wissen, wie viel DNA tatsächlich ins Innere der Zelle gelangt. Um die Menge an DNA zu bestimmen, die an der Partikeloberfläche adsorbiert, wurden die Partikel nach der Synthese abzentrifugiert und die Menge an DNA im Überstand bestimmt. Die DNA wurde mit dem Farbstoff PicoGreen<sup>®</sup>, der für doppelsträngige DNA spezifisch ist, quantifiziert.<sup>[89]</sup> Zunächst wurde die Kinetik der DNA-Adsorption untersucht, indem die synthetisierten Partikel nach unterschiedlich langen Zeiträumen abzentrifugiert wurden, um dann die DNA im Überstand zu quantifizieren.

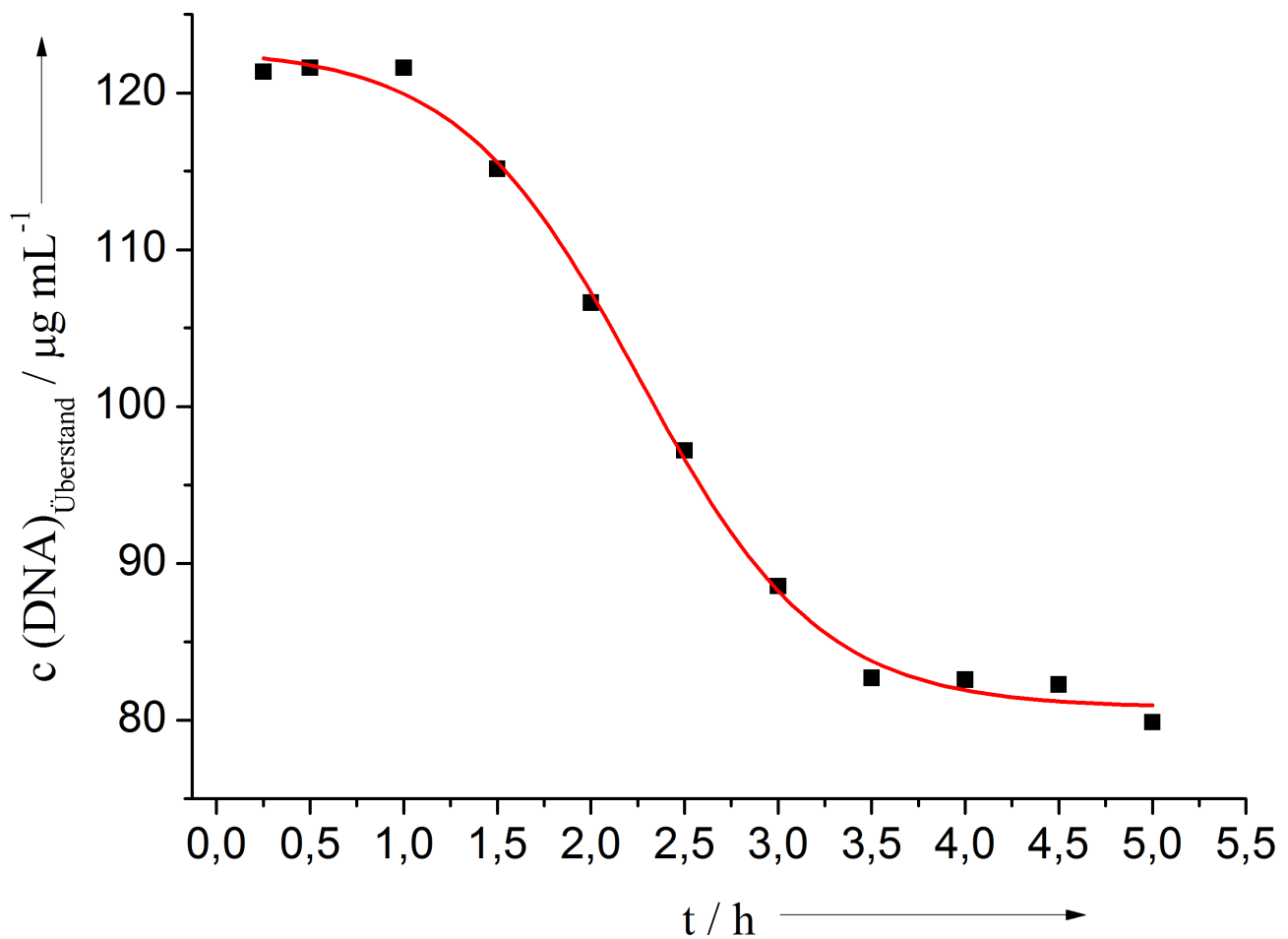


Abbildung 51: Konzentration von DNA im Überstand nach der Zentrifugation als Funktion der Zeit.

In Abbildung 51 ist der Verlauf der DNA-Konzentration im Überstand als Funktion der Zeit zu sehen. Die Anfangskonzentration der DNA beträgt  $167 \text{ mg mL}^{-1}$ ; in der ersten Viertelstunde wird also fast ein Viertel der eingesetzten DNA adsorbiert. Bis die maximale Menge DNA adsorbiert ist, dauert es vier Stunden. Die Adsorption verläuft also recht langsam.

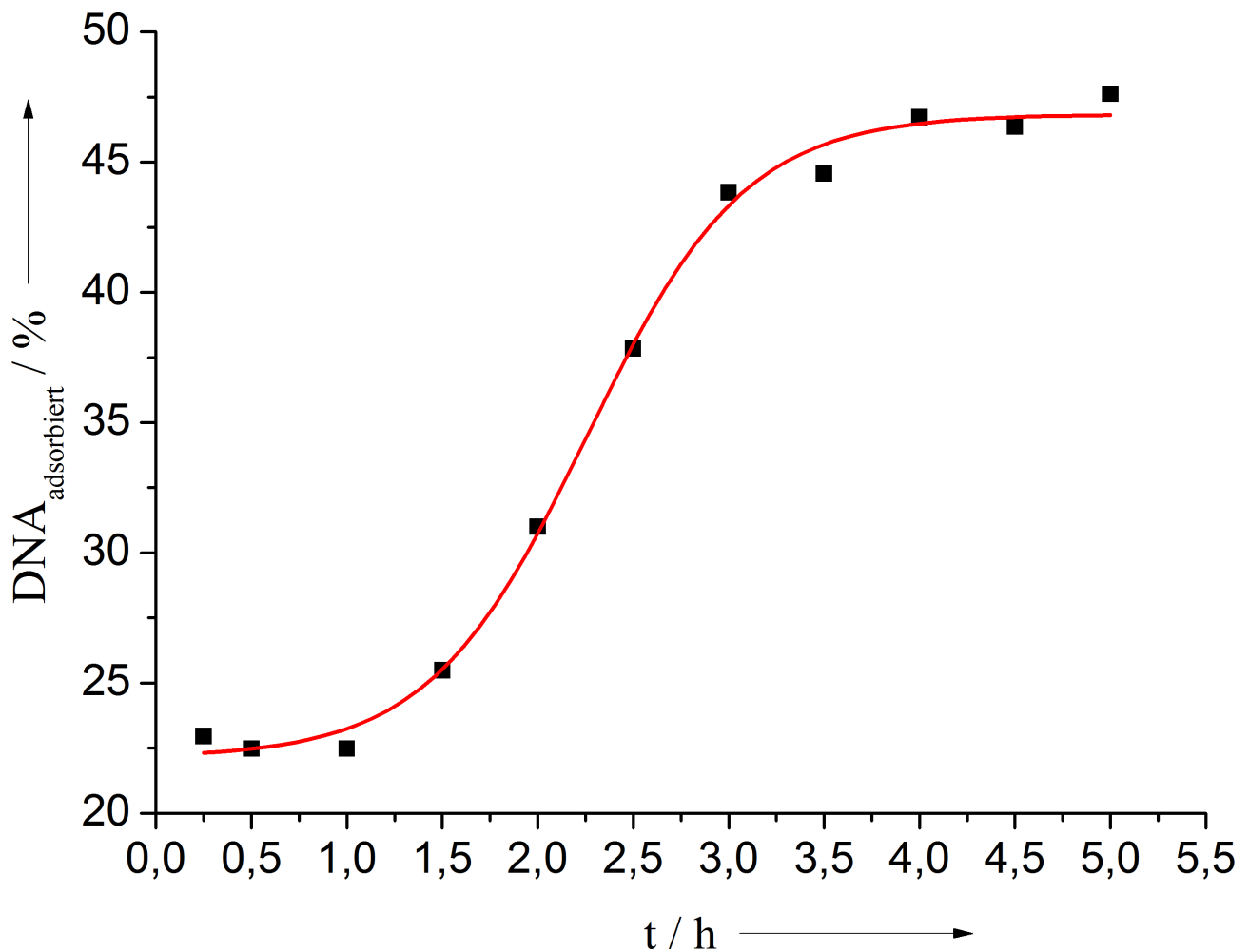


Abbildung 52: Prozentualer Verlauf der DNA-Adsorption an der Partikeloberfläche als Funktion der Zeit.

In Abbildung 52 ist der prozentuale Verlauf der DNA-Adsorption an der Partikeloberfläche zu erkennen. Nach vier Stunden, wenn die maximale Beladung der Partikel mit DNA erreicht ist, sind 45 % der eingesetzten DNA an der Partikeloberfläche adsorbiert.

Um die Effizienz der DNA-Adsorption zu verbessern, wurde die Menge an adsorbierter DNA in Abhängigkeit von der zugegebenen DNA-Menge untersucht. Die Proben wurden jeweils nach vier Stunden zentrifugiert, damit die Partikel die maximale Menge DNA adsorbieren können.

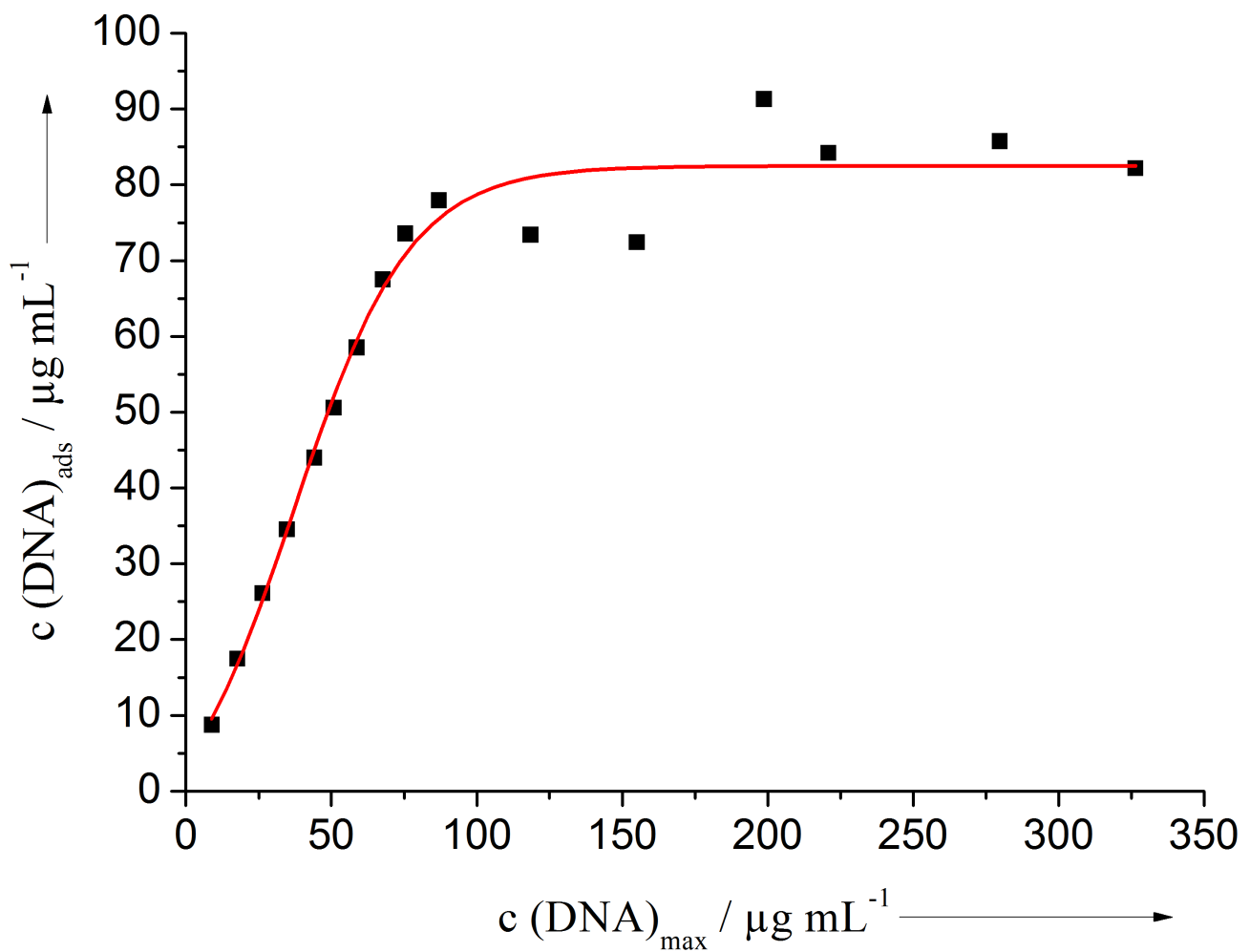


Abbildung 53: Abhängigkeit der adsorbierten Menge DNA von der eingesetzten DNA-Menge.

In Abbildung 53 ist zu erkennen, dass die eingesetzte DNA bei geringen Mengen nahezu vollständig an der Partikeloberfläche adsorbiert wird. Bei einem Grenzwert von  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  ist das Maximum der adsorbierbaren Menge DNA erreicht. Allerdings sind die Nanopartikel erst ab einer DNA-Konzentration von  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$  für länger als drei Stunden stabil, bei einer geringeren Konzentration aggregieren die Partikel und flocken innerhalb einer Stunde aus.

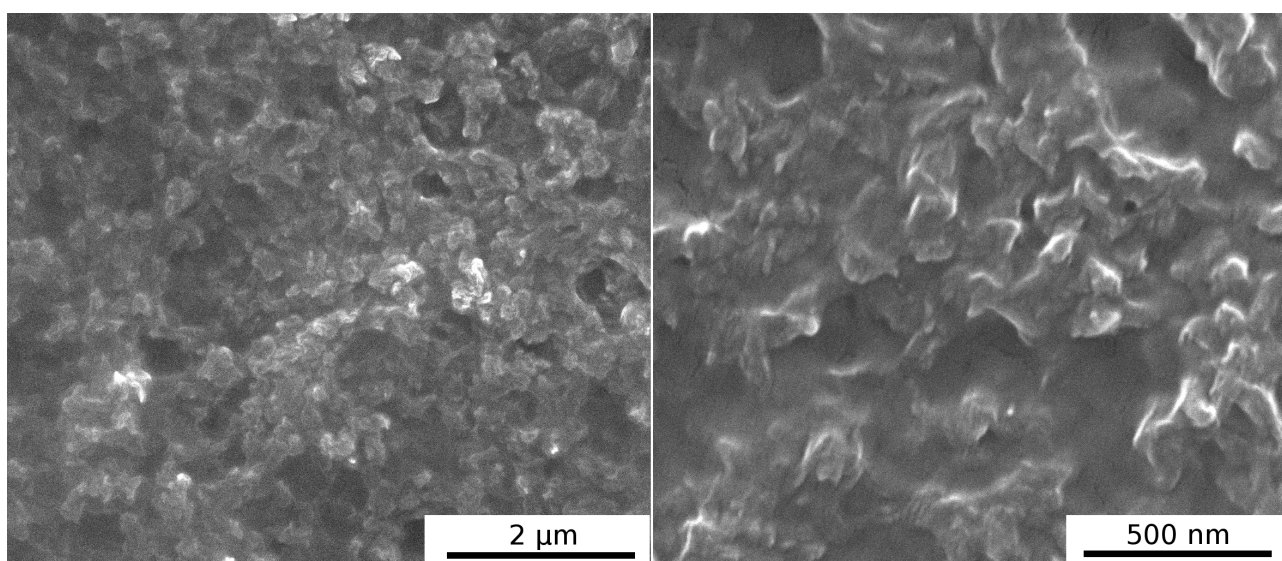


Abbildung 54: REM-Aufnahmen von Calciumphosphat-Nanopartikeln, funktionalisiert mit  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  DNA.

Die REM-Aufnahmen in Abbildung 54 zeigen Calciumphosphat-Nanopartikel, die mit  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  DNA funktionalisiert wurden. Im Vergleich mit Abbildung 50 kann man hier einzelne Partikel erkennen. Diese haben eine Größe von 80-100 nm und sind stark aggregiert. Auch bei diesen Aufnahmen zeigt sich ein DNA-Film, der über den Partikeln liegt. Die Wechselwirkungen zwischen den Calciumphosphat-Nanopartikeln und DNA scheinen nicht sehr stark zu sein, so dass sich die DNA beim Trocknen der Partikel auf dem Wafer von der Partikeloberfläche löst.

Die Untersuchungen zur maximal adsorbierbaren Menge DNA an der Oberfläche von Calciumphosphat-Nanopartikeln zeigen, dass ein Überschuss an DNA benötigt wird, um die Partikel über einen längeren Zeitraum zu stabilisieren.

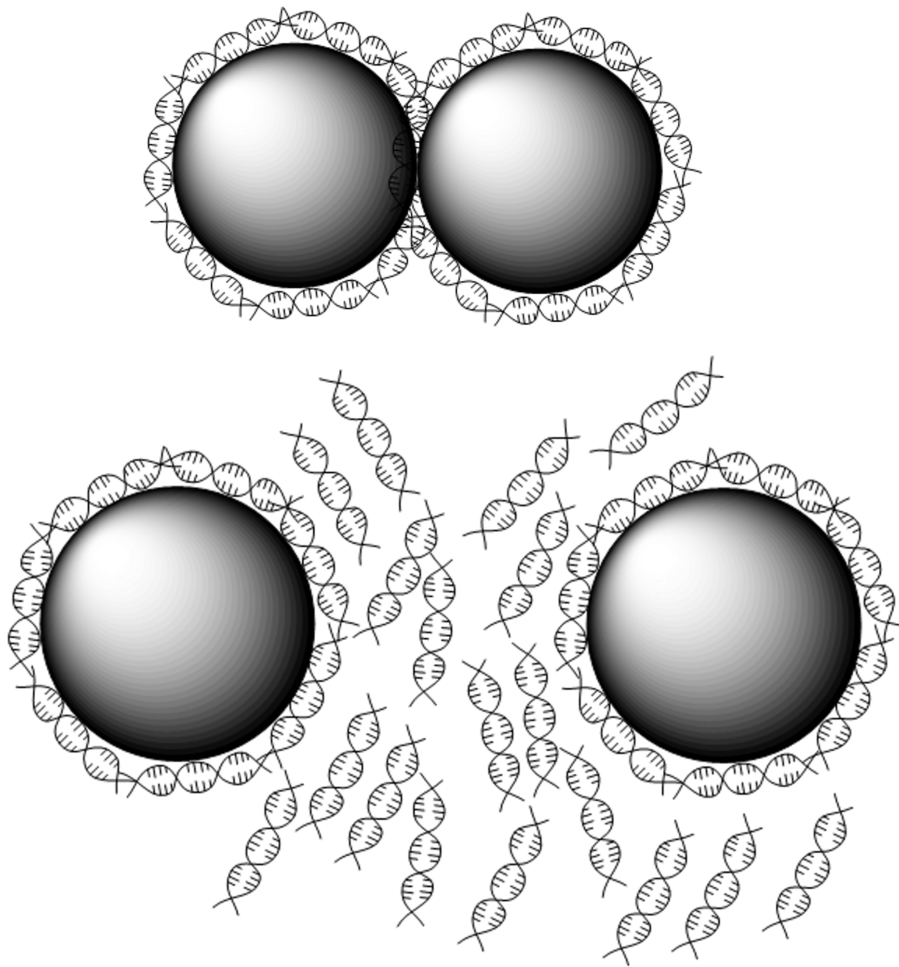


Abbildung 55: Schematische Darstellung zur Stabilität von Calciumphosphat-DNA-Nanopartikeln.

Die zugegebene DNA adsorbiert an der Partikeloberfläche, bis ein Maximum erreicht ist und sich keine neue DNA mehr anlagern kann. Diese Schicht reicht allerdings nicht aus, um die Partikel zu stabilisieren. Die Partikel durchdringen bei gegenseitiger Annäherung die DNA-Schicht und aggregieren zu größeren Partikeln. Höhere Mengen an DNA stabilisieren die Partikel, jedoch lagert sich der DNA-Überschuss nicht an der Partikeloberfläche an. Wahrscheinlich hat ein Überschuss an DNA zwei Effekte auf die Stabilität der Partikel. Zum einen wird durch eine höhere DNA-Konzentration die Viskosität der Dispersion erhöht, wodurch die Beweglichkeit der Partikel eingeschränkt wird. Zum anderen haben die DNA-Moleküle einen sterischen Einfluss,

wenn sich viele DNA-Moleküle zwischen den Nanopartikeln befinden. Dies ist in Abbildung 55 schematisch dargestellt.

### 4.2.4. Vergleich der DNA-Quantifizierung mit PicoGreen® und über die UV-Absorption

Da sich die DNA-Konzentration auch über UV-Messungen bestimmen lässt,<sup>[88]</sup> wurde die Genauigkeit beider Methoden miteinander verglichen. Ein direkter Vergleich der DNA-Lösung ohne Calciumphosphat-Nanopartikel ist nicht möglich, weil die Konzentration der Referenz-DNA für die Bestimmung mit PicoGreen® über eine UV-Messung bestimmt wird.

Für die Vergleichsmessungen wurden jeweils 0,5 mL der Calcium-*L*-lactat-Lösung und der *di*-Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung gemischt und mit 60 µL DNA-Lösung (1 mg mL<sup>-1</sup>) versetzt. Nach 4 Stunden wurden die Partikel abzentrifugiert (151000 g) und die DNA-Menge im Überstand jeweils mit PicoGreen® und über die UV-Absorption bestimmt.



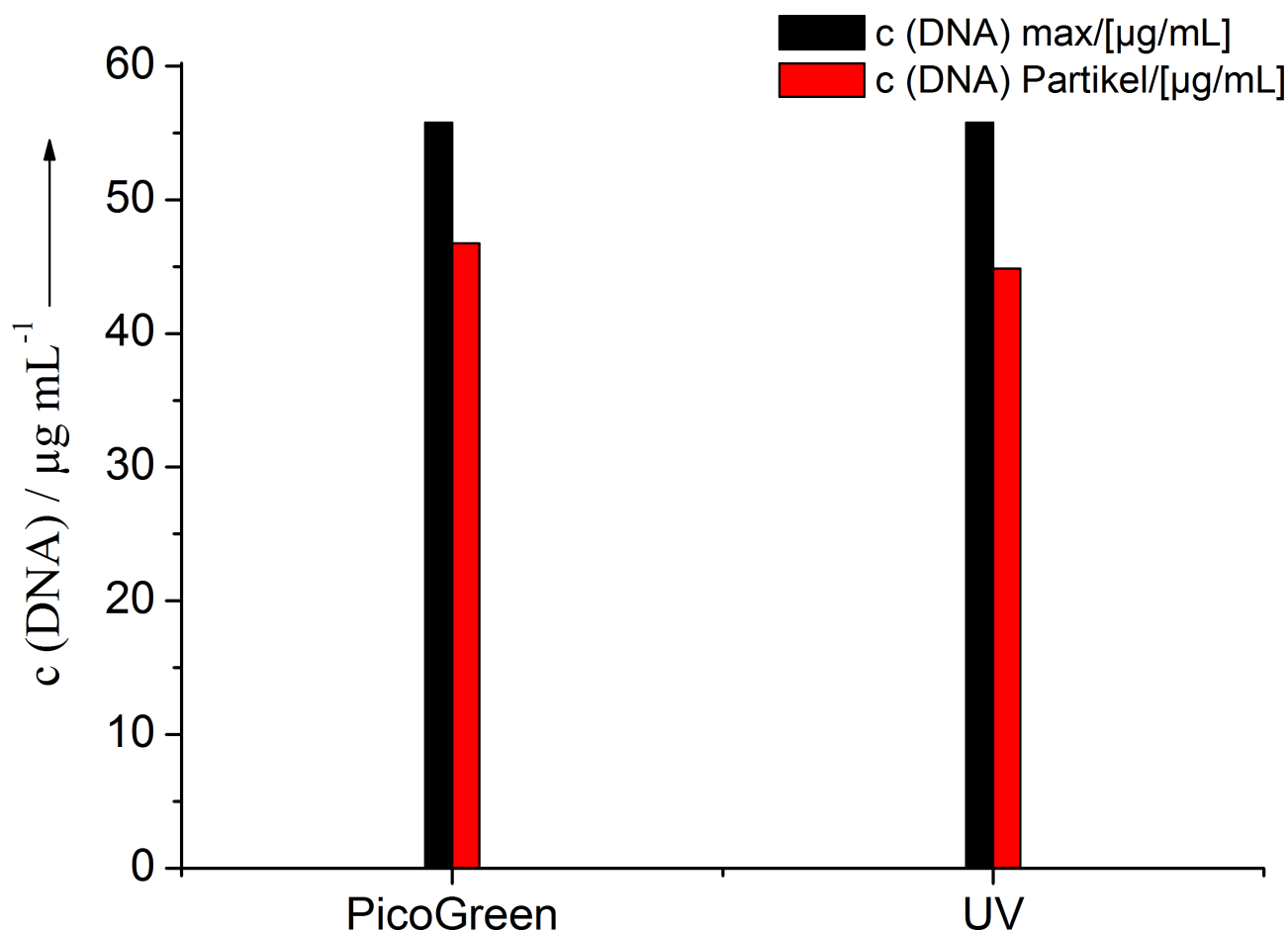


Abbildung 56: Vergleich der DNA-Konzentration, gemessen mit PicoGreen® (links) und mit der UV-Absorption (rechts). Gezeigt ist jeweils die Menge der eingesetzten DNA (schwarze Balken) und die an der Partikeloberfläche adsorbierte DNA (rote Balken).

In Abbildung 56 ist der Vergleich der DNA-Quantifizierung mit dem Farbstoff PicoGreen® und der DNA-Konzentrationsbestimmung über die UV-Absorption bei 260 nm gezeigt. Die Konzentration der eingesetzten DNA ist bei beiden Methoden gleich, da diese Konzentration für die Quantifizierung mit PicoGreen® über die UV-Absorption bestimmt wurde. Bei der Menge der an der Partikeloberfläche adsorbier-ten DNA zeigen sich kleine Unterschiede. Mit PicoGreen® wurde eine DNA-Konzentration von  $46,75 \pm 0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$  bestimmt, über die UV-Absorption eine Konzentrati-

on von  $44,87 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Dieser geringe Unterschied ist allerdings vernachlässigbar. Die UV-Absorption ist aber nur für reine DNA zuverlässig, da sowohl RNA als auch Proteine ähnliche Absorptionsbanden aufweisen und so die Quantifizierung verfälschen können.<sup>[90]</sup>

### 4.2.5. Zusammenfassung

Für verlässliche Ergebnisse bei der Transfektion von Zellen mit Calciumphosphat-DNA-Nanopartikeln ist es wichtig die genaue Menge der adsorbierten DNA zu kennen. Die DLS-Messungen und REM-Aufnahmen der durch Sokolova *et al.* etablierten Nanopartikel deuten auf einen Überschuss DNA hin, der die Größenbestimmung der Nanopartikel unmöglich macht. Dies konnte durch die Quantifizierung der DNA mit dem spezifischen Farbstoff PicoGreen<sup>®</sup> bestätigt werden. So wird bei der etablierten Methode von der eingesetzten DNA lediglich die Hälfte an der Partikeloberfläche adsorbiert. Wird mehr DNA zu den Nanopartikeln gegeben, so zeigt sich, dass das Maximum der DNA-Adsorption bei einer Konzentration von  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  liegt. Allerdings weisen Calciumphosphat-Nanopartikel, die mit einer Konzentration von  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  funktionalisiert werden, eine verminderte Stabilität im Vergleich zu den nach der etablierten Methode synthetisierten Nanopartikeln auf. So konnte gezeigt werden, dass die DNA bei Zugabe von geringeren Mengen zwar komplett adsorbiert wird, die Partikel dann aber nach wenigen Stunden ausflocken.

Ein Vergleich von PicoGreen<sup>®</sup> mit der UV-Absorption zur Konzentrationsbestimmung der DNA zeigt in diesem Fall nur einen vernachlässigbaren Unterschied. Dies gilt aber nur für reine DNA. Viele Verunreinigungen, wie z. B. RNA oder Proteine, verfälschen das Ergebnis, da sie in einem ähnlichen Bereich absorbieren.

### 4.3. Beschichtung von nanostrukturierten Siliciumwafern mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln

Die Interaktion zwischen Zellen und Oberflächen ist vor allem bei Implantaten im Knochenkontakt von großer Bedeutung. Damit das Implantat gut mit dem Knochen verwächst, müssen die Osteoblasten, die knochenbildenden Zellen, gut an der Implantatoberfläche anhaften.<sup>[91]</sup> Hierbei scheint das Material nicht von Bedeutung zu sein. Für eine gute Zellhaftung und Zellorientierung scheint lediglich die Oberflächenbeschaffenheit von Bedeutung zu sein.<sup>[92]</sup> So wurde eine Zellausrichtung auf Titan und Hydroxylapatit,<sup>[93]</sup> Polystyrol,<sup>[94]</sup> Silizium,<sup>[95]</sup> und sogar auf einer PTFE-Oberfläche<sup>[96]</sup> beobachtet. Die untersuchten Materialien wurden dabei aber häufig nicht direkt mikrostrukturiert. Titan und Hydroxylapatit wurden auf mikrostrukturierte Si-Substrate aufgedampft. Ebenso wurde für die Herstellung des mikrostrukturierten Polystyrolsubstrates ein entsprechend mikrostrukturiertes Goldsubstrat als Stempel verwendet. Lediglich die PTFE-Oberfläche wurde direkt mit einem Laser mikrostrukturiert.

Die Gründe für eine Ausrichtung von Zellen an mikrostrukturierten Implantaten sind noch nicht geklärt. Einerseits wird vermutet, dass die Mikrotopographie für eine verbesserte Anhaftung von Fibrin sorgt, wodurch die Anhaftung von Osteoblasten gefördert wird.<sup>[97]</sup> Andererseits kann auch die Synthese der extrazellulären Matrix durch die anhaftenden Zellen durch die Mikrotopographie verbessert werden.<sup>[98-100]</sup>

Die Veränderung der Nanotopographie wird meist durch eine Beschichtung des Substrates erreicht. Als Materialien für die Beschichtung werden Nanopartikel,<sup>[101-103]</sup> Polymere<sup>[104-106]</sup> und Moleküle, die selbst-organisierende Monolagen (engl. *self-assembled monolayers*, *SAMs*) bilden, verwendet.<sup>[107-111]</sup> Solche nanostrukturierten Materialien sind vor allem als Wirkstoffträgersystem interessant, da sie die Möglichkeit bieten, mit der richtigen Beschichtung die erforderliche Menge an Wirkstoff zu reduzieren und eine potentielle Immunantwort zu reduzieren.<sup>[112-117]</sup> Hierbei werden allerdings

mehrere Anforderungen an die Oberfläche gestellt. Zum einen müssen die Wirkstoff-trägersysteme auf der Oberfläche immobilisiert werden können, ohne dass dies den auf der Oberfläche angesiedelten Zellen schadet. Spezielle Polystyrol-Oberflächen sowie SAMs sind hierfür gut geeignet.<sup>[118, 119]</sup> Zum anderen müssen geeignete Trägersysteme gefunden werden, um die benötigte Menge an Wirkstoff zu reduzieren. Hierfür werden häufig kationische Polymere wie PEI oder Poly-*L*-lysin (PLL) verwendet, da sie Nukleinsäuren gut komplexieren können.<sup>[120]</sup>

Die häufigste Methode zur optischen Oberflächenstrukturierung ist die Lithographie.<sup>[121-126]</sup> Bei der optischen Lithographie wird das Substrat zunächst mit einem Fotolack beschichtet, der im Anschluss durch eine Maske belichtet wird. So bildet sich auf der Oberfläche eine entsprechende Struktur aus gehärtetem Fotolack, der unbelichtete Lack wird entfernt und die darunter liegende Substratoberfläche kann durch Ätzen oder Metallbeschichtung strukturiert werden. Lithographische Verfahren sind allerdings sehr teuer und das Auflösungsvermögen ist durch die Wellenlänge der verwendeten Strahlung begrenzt.

Durch die Verwendung von linear polarisierten Femtosekunden-Laserpulsen kommt es zu einer Ausbildung von Nanostrukturen auf Oberflächen.<sup>[127, 128]</sup> Diese *laser-induced periodic surface structures* (LIPSS) teilen sich auf in *low spatial frequency* LIPSS (LSFL), deren Periodizität im Bereich der verwendeten Wellenlänge liegt, und *high spatial frequency* LIPSS (HSFL), deren Periodizität weit unterhalb der verwendeten Wellenlänge liegt.<sup>[129]</sup> Während LSFL durch die optische Interferenz des Laserstrahls mit einer elektromagnetischen Oberflächenwelle, die während der Bestrahlung entsteht, gebildet werden,<sup>[130-133]</sup> gibt es noch keine einheitliche Theorie zur Entstehung von HSFL. So gibt es Theorien, die sich mit Interferenzeffekten in Zusammenhang mit vorübergehenden Änderungen der optischen Eigenschaften,<sup>[134]</sup> mit einer Frequenzverdopplung,<sup>[135-137]</sup> der Anregung von Oberflächenplasmonen,<sup>[138, 139]</sup> oder einer Selbstorganisation beschäftigen.<sup>[140]</sup>

In dieser Arbeit sollen Si-Wafer, die mit HSFL strukturiert wurden, elektrophoretisch mit DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln beschichtet werden. Dabei sollen die Partikel nur innerhalb der Nanostrukturen abgeschieden werden. Durch die Übertragung der Partikel auf ein Alginatgel erhält man ein nanostrukturiertes, bioaktives Alginatgel, um den Einfluss solcher Strukturen auf Zellen zu untersuchen.

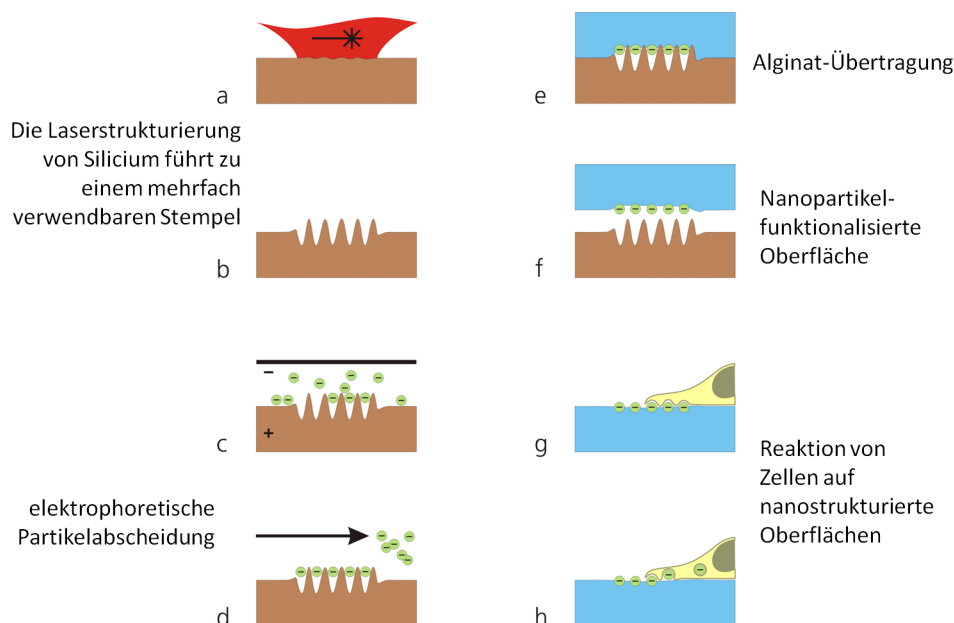


Abbildung 57: Schematische Darstellung der geplanten Arbeitsschritte.

### 4.3.1. Experimenteller Teil

Als Modellsystem wurden PEI-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel verwendet. Diese lassen sich leicht in einem halb-kontinuierlichen Prozess synthetisieren und sind aufgrund ihrer hohen Oberflächenladung gut für die elektrophoretische Abscheidung geeignet.

Eine 18 mM Calcium-*L*-lactat-Lösung und eine 10,8 mM *di*-Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung werden mit  $\text{NH}_4\text{OH}$  auf einen pH-Wert von 9 eingestellt. Die beiden Lösungen werden mit einer Peristaltikpumpe in einen Dreihalskolben mit Überlauf gepumpt, der Volumenstrom pro Schlauch ist  $2,8 \text{ mL min}^{-1}$ . Zusätzlich wird über

eine weitere Peristaltikpumpe eine PEI-Lösung der Konzentration  $2 \text{ g L}^{-1}$  mit einem Volumenstrom von  $5,6 \text{ mL min}^{-1}$  gepumpt, so dass die entstehenden Nanopartikel direkt funktionalisiert werden. Über den Überlauf fließt die Dispersion in einen Büchnertrichter und die Partikel werden über einen Filter mit  $100 \text{ nm}$  Porengröße abfiltriert. Im Anschluss werden die Partikel mit Wasser gewaschen und gefriergetrocknet. Für die elektrophoretische Beschichtung werden die Partikel mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  in 2-Propanol redispergiert.

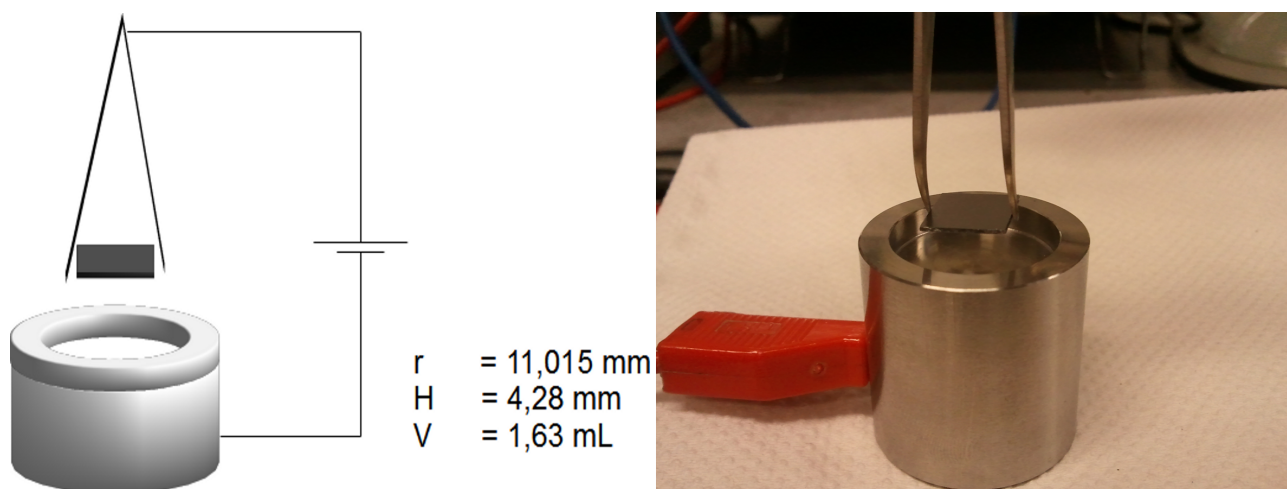


Abbildung 58: Apparatur zur elektrophoretischen Abscheidung von Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln.

Die Apparatur für die elektrophoretische Abscheidung der Nanopartikel ist in Abbildung 72 dargestellt. Sie besteht aus einem Edelstahlbecher, der als Vorratsgefäß für kleine Volumina der Dispersion und zugleich als Anode dient. Die Kathode ist das Substrat, auf dem die Partikel abgeschieden werden. Diese wird über eine Pinzette mit dem Netzgerät verbunden.

### 4.3.2. Nanostrukturierte Siliciumwafer

Die in dieser Arbeit verwendeten, nanostrukturierten Si-Wafer wurden am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik in St. Ingbert von der Arbeitsgruppe von Prof.

Zimmermann hergestellt. Die Nanostrukturen wurden mit einem Titan:Saphir Laser mit einer Anregungswellenlänge von 800 nm, einer Pulsdauer von 140 fs, einer Wiederholungsrate von 80 MHz und einer Energie von 40 nJ Puls<sup>-1</sup> hergestellt.<sup>[141]</sup>

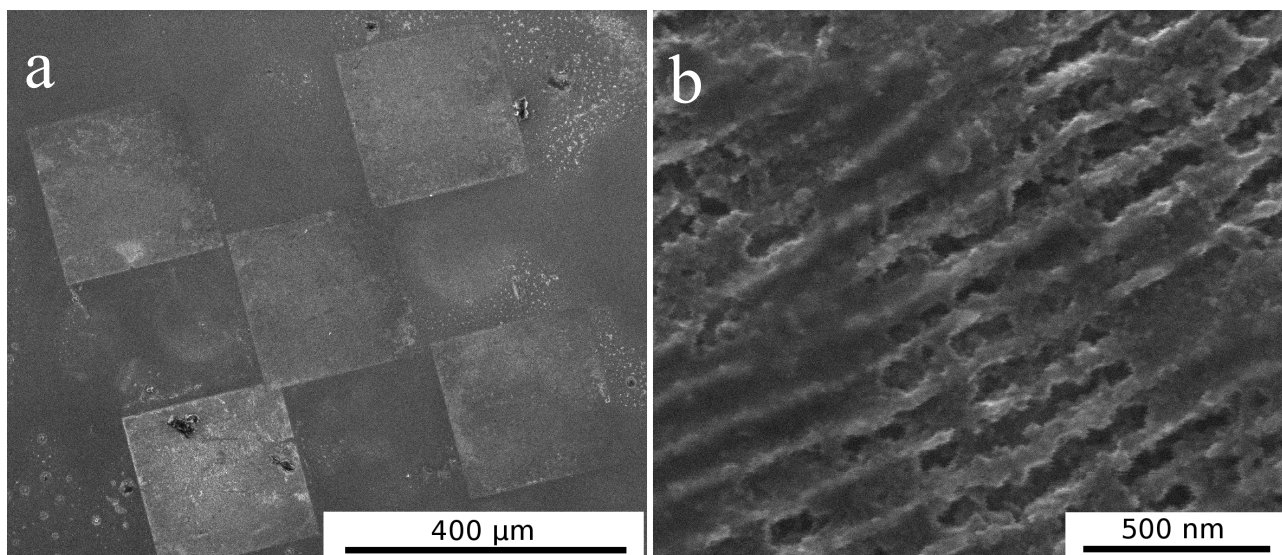


Abbildung 59: REM-Aufnahme von LIPSS auf einem Si-Wafer.

Die Strukturen lassen sich großflächig (bis zu 1 cm<sup>2</sup>) herstellen. Abbildung 59a zeigt einen kompletten strukturierten Bereich, der aus einzelnen Feldern mit einer Kantenlänge von 230 µm besteht. Die einzelnen Felder wiederum bestehen aus den sogenannten *ripples*, die eine Periodizität von ca. 110 nm aufweisen. Die Vertiefungen sind teilweise noch durch den Abtrag der Laserstrukturierung verdeckt.

### 4.3.3. Charakterisierung der PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel

Für die Beschichtung der nanostrukturierten Si-Wafer wurden PEI-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel verwendet. Durch die hohe positive Oberflächenladung lassen sich diese gut elektrophoretisch abscheiden.<sup>[142]</sup> PEI kann DNA gut komplexieren und wird deshalb ebenfalls als Träger für die Transfektion eingesetzt.<sup>[76, 143]</sup> Die Transfektionseffizienz von PEI-DNA-Polyplexen korreliert mit dem Molekular-

gewicht des Polymers, so dass lange Polymerketten eine bessere Transfektionseffizienz aufweisen. Allerdings steigt mit dem Molekulargewicht auch die Toxizität von PEI, so dass bei der Verwendung ein Kompromiss zwischen hoher Transfektionseffizienz und niedriger Toxizität gefunden werden muss.<sup>[68]</sup>

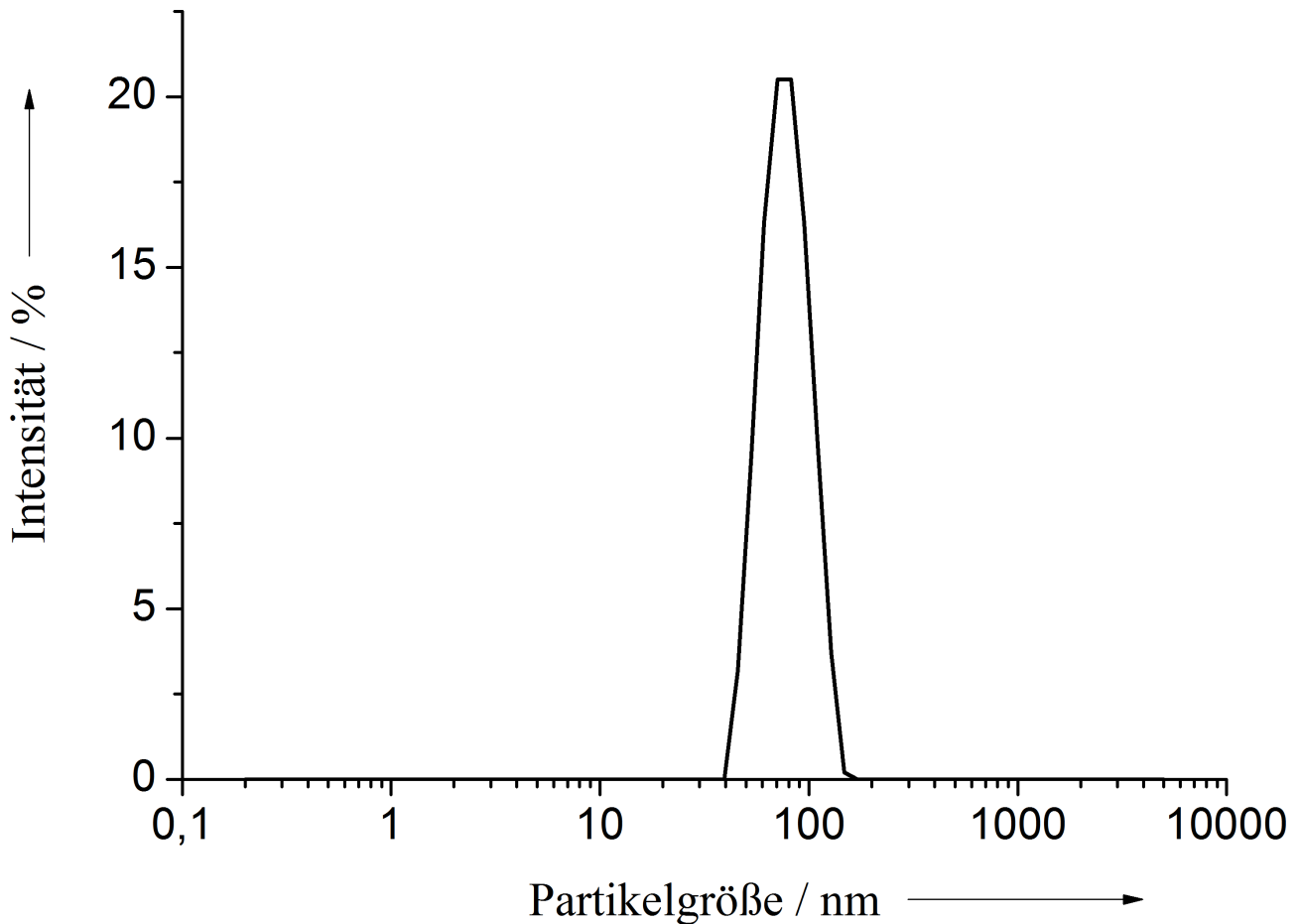


Abbildung 60: DLS-Messung von Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln in Wasser.

Die DLS-Messung in Abbildung 60 zeigt, dass die mit PEI funktionalisierten Partikel einen durchschnittlichen Durchmesser von 75 nm haben. Die Dispersion kann mit einem PDI von 0,044 als monodispers bezeichnet werden.



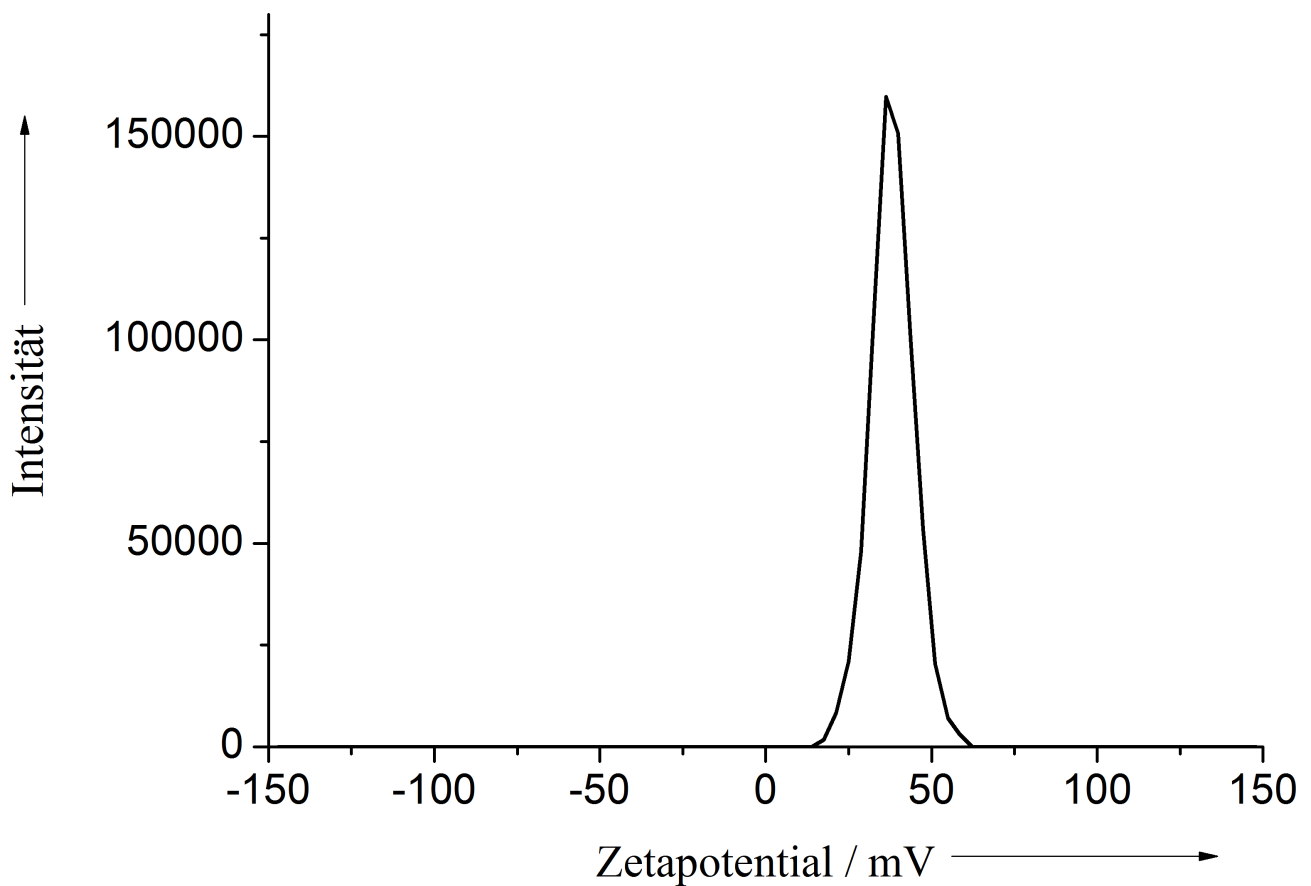


Abbildung 61: Zetapotential der PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die Zetapotentialmessung in Abbildung 61 zeigt ein Zetapotential von +38 mV und belegt eine elektrostatische Stabilisierung der Nanopartikel. Zudem belegt die hohe Oberflächenladung auch, dass sich die Partikel gut für eine elektrophoretische Abscheidung eignen.

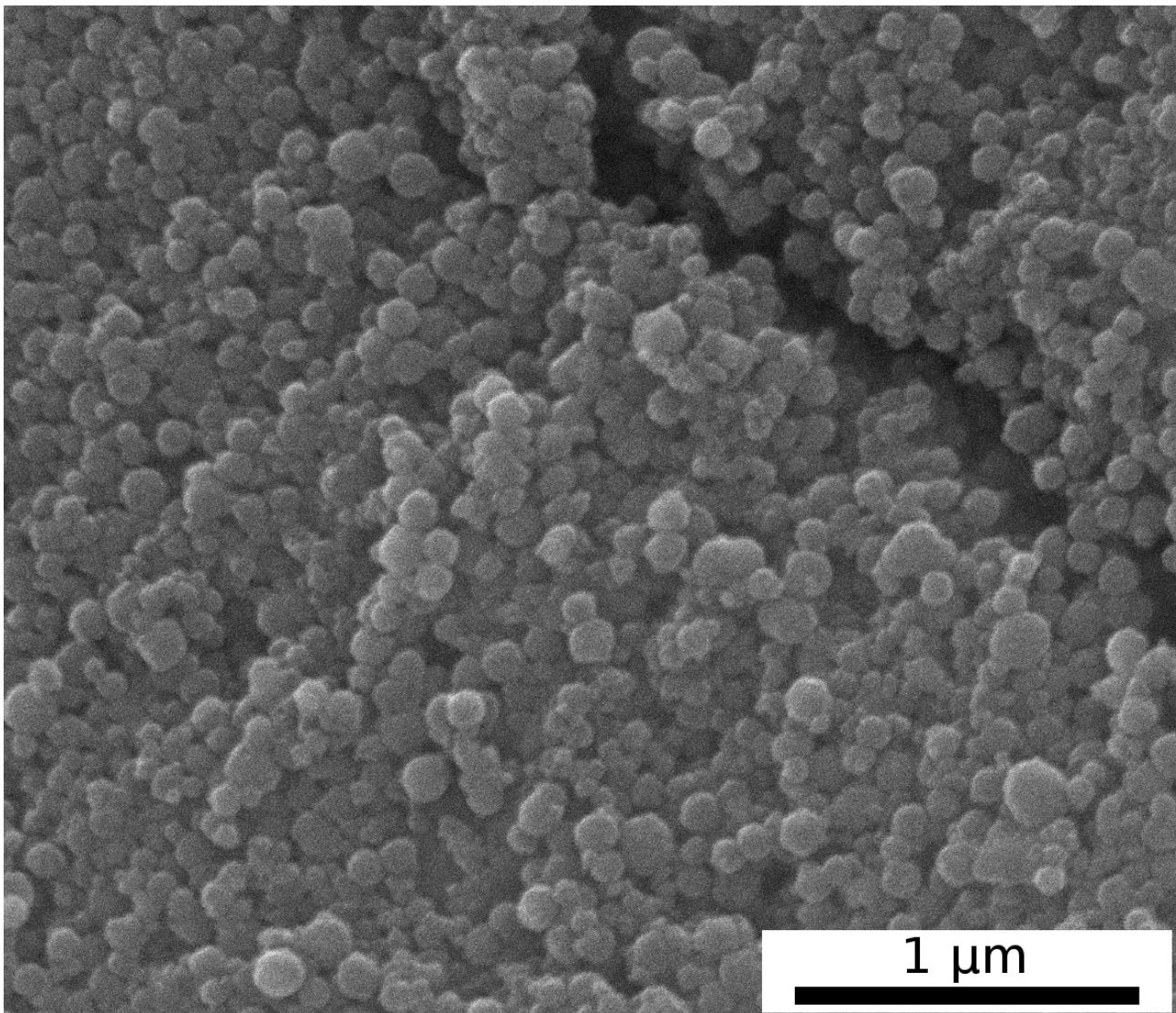


Abbildung 62: REM-Aufnahme der PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die REM-Aufnahme in Abbildung 62 zeigt, dass die Partikel eine sphärische Morphologie aufweisen. Der durchschnittliche Durchmesser der Partikel liegt bei 70-100 nm, es sind aber auch kleinere Partikel mit einem Durchmesser von 60 nm und größere Partikel mit einem Durchmesser bis zu 130 nm zu erkennen. Der durchschnittliche Partikeldurchmesser aus den REM-Aufnahmen stimmt mit der Größe aus den DLS-Messungen gut überein.

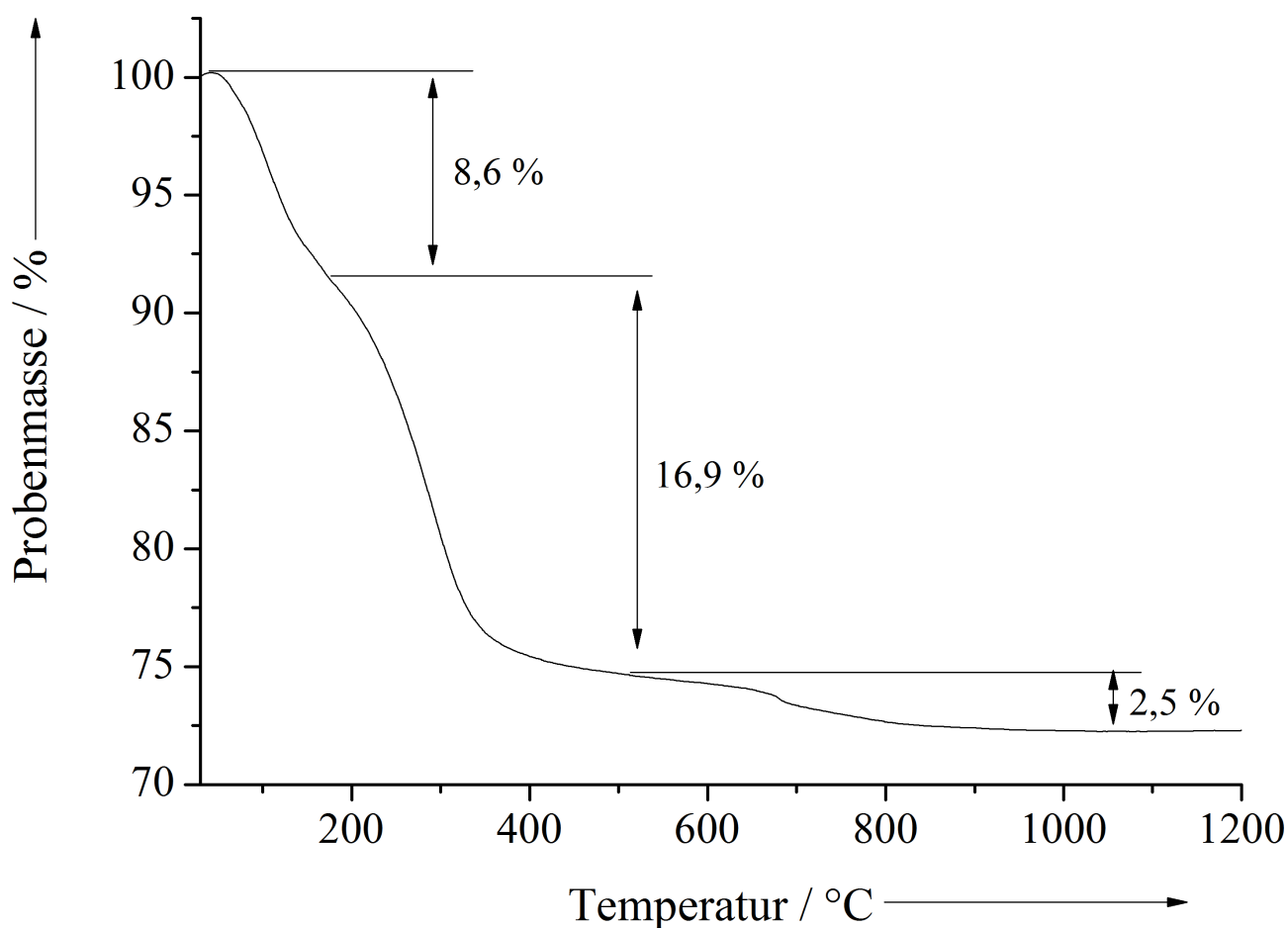


Abbildung 63: Thermogramm der PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel, gemessen in einer Sauerstoffatmosphäre ( $50 \text{ mL min}^{-1}$ ) mit einer Heizrate von  $1 \text{ K min}^{-1}$ .

Das Thermogramm in Abbildung 63 zeigt den Massenverlust durch das Aufheizen der PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel. Über den Temperaturbereich von  $20 \text{ °C}$  bis  $1200 \text{ °C}$  zeigen sich drei Stufen im Massenverlust. Der erste Massenverlust von  $8,6 \text{ Gew.-%}$ , in einem Temperaturbereich von  $50 \text{ °C}$  bis  $170 \text{ °C}$ , ist auf den Verlust von in die Partikel eingelagertem Wasser zurückzuführen. Direkt an die erste Stufe schließt sich ein zweiter Massenverlust an, im Temperaturbereich von  $170 \text{ °C}$  bis  $500 \text{ °C}$ . Diese Stufe, mit einem Massenverlust von  $16,9 \text{ Gew.-%}$  zeigt die Verbrennung des Polymers an. Im Temperaturbereich von  $500 \text{ °C}$  bis  $1000 \text{ °C}$  ist

der dritte Massenverlust mit 2,5 Gew.-% zu sehen. In diesem Temperaturbereich wird  $\text{CO}_2$  aus den Partikeln freigesetzt, das aus Carbonationen entsteht, die während der Synthese in die Partikel eingebaut wurden. Im Vergleich mit den Lanthanid-dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikeln aus Kapitel 4.1.7 findet sich bei den PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln die fünffache Menge PEI. Die höhere Menge des Polymers ist hauptsächlich auf die Synthese zurückzuführen. Während die Lanthanid-dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikel erst nach der Synthese mit PEI funktionalisiert wurden, wurde bei den Calciumphosphat-Nanopartikeln schon während der Synthese PEI zugegeben. Dabei wurde möglicherweise ein Teil des Polymers von den Partikeln während der Bildung umschlossen, so dass sich das Polymer vermutlich z. T. im Innern der Partikel befindet.

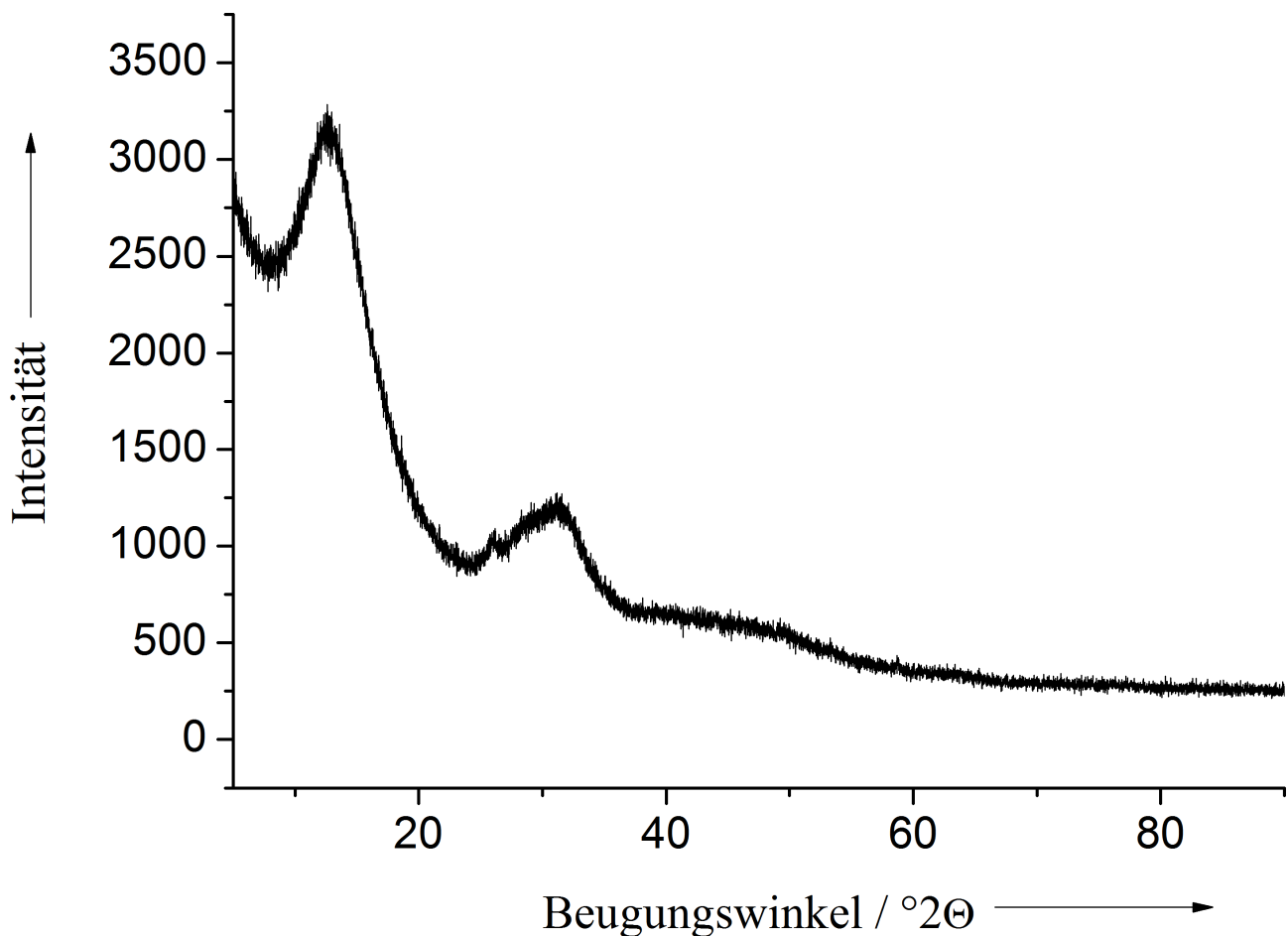


Abbildung 64: Diffraktogramm der PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Das Diffraktogramm in Abbildung 64 zeigt, dass die Calciumphosphat-PEI-Nanopartikel nahezu völlig röntgenamorph sind. Im Diffraktogramm ist lediglich eine breite Erhöhung der Basislinie im Bereich von 25 °2Θ bis 37 °2Θ. Im Bereich 10 °2Θ ist noch ein breites Maximum zu erkennen, das allerdings vom Probenträger, einem Glasträger, stammt.

#### 4.3.4. Beschichtung von nanostrukturierten Si-Wafern mit Goldnanopartikeln

Um die generelle Möglichkeit der Partikelabscheidung innerhalb der Nanostrukturen zu überprüfen, wurden zunächst Versuche mit Goldnanopartikeln durchgeführt, die

sich mit einem Durchmesser von 15 nm deutlich unterhalb der Periodizität der *ripples* bewegen. Die Goldnanopartikel sind mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) funktionalisiert. Das Polymer besitzt zwar keine Ladungsträger, trotzdem zeigen die so funktionalisierten Nanopartikel ein leicht negatives Zetapotential. Der Grund für das vorhandene Oberflächenpotential sind an der Oberfläche adsorbierte Citrat-Ionen, die für die Synthese der Goldnanopartikel verwendet wurden.

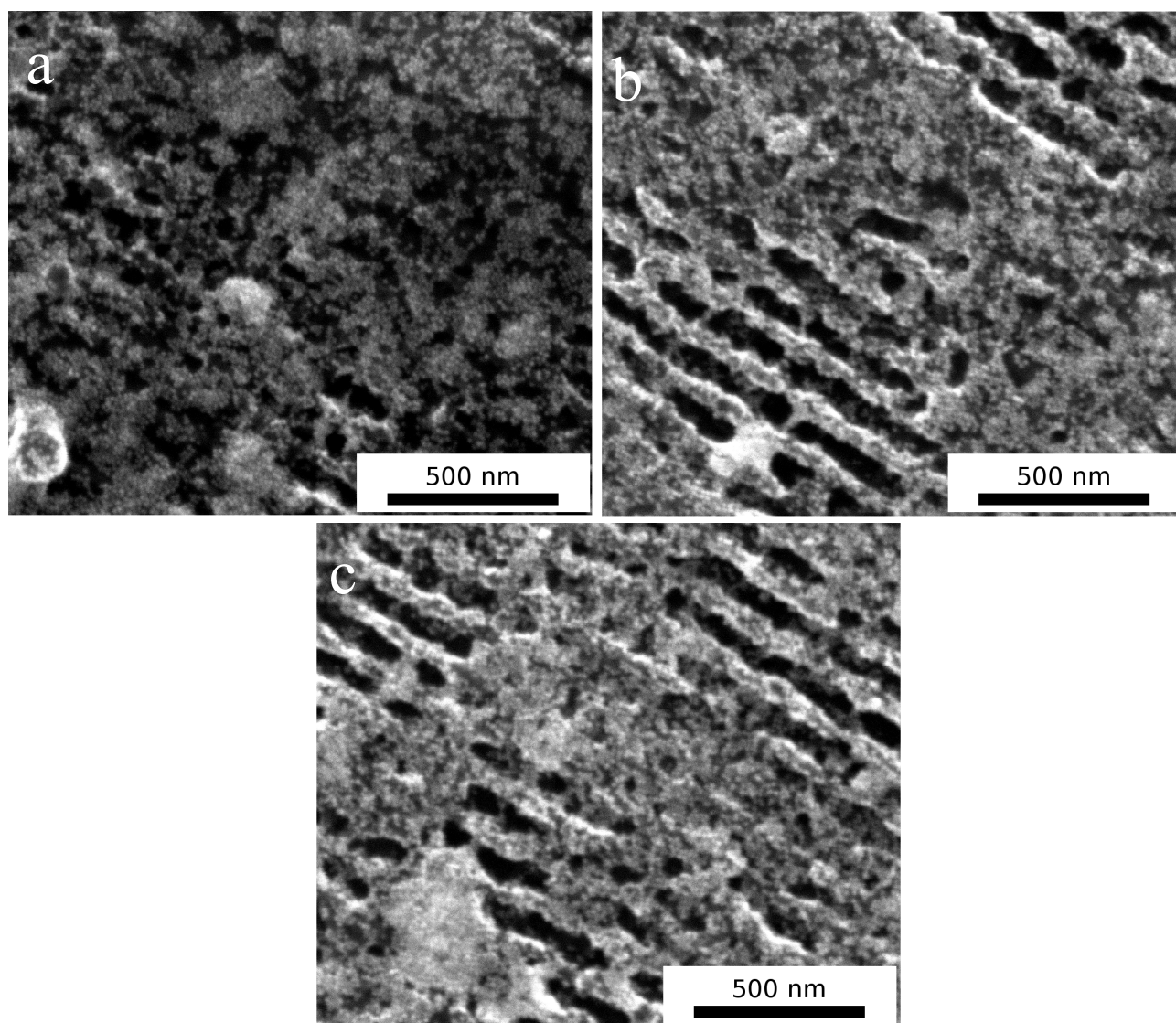


Abbildung 65: REM-Aufnahmen eines nanostrukturierten Si-Wafers, beschichtet mit Au-PVP-Nanopartikeln bei 50 V für 30 s.

Abbildung 65 zeigt, dass die Schicht aus Goldnanopartikeln auf dem nanostrukturier-

ten Si-Wafer nicht einheitlich ist. Die Partikel bilden Aggregate, die die Nanostrukturen teilweise verdecken. Die Partikel sind wesentlich kleiner als die *ripples*, und in Abbildung 65b und c ist zu erkennen, dass sich die Partikel auch innerhalb der Strukturen abscheiden lassen. Allerdings muss die Aggregation der Partikel bei der Abscheidung verhindert werden. Die größeren Calciumphosphat-PEI-Nanopartikel passen nur einzeln in die *ripples*, so dass eine Aggregation dieser Partikel die Nanostrukturen verdecken würde, ohne dass sich die Partikel in den Nanostrukturen absetzen würden.

### 4.3.5. Einfluss der Abscheidespannung und -zeit auf die Beschichtung nanostrukturierter Si-Wafer

Die Calciumphosphat-Nanopartikel sollen sich für die Übertragung auf ein Alginatgel nur in den *ripples* befinden. Zunächst wurde der Einfluss der Abscheidespannung und der Abscheidezeit auf die Beschichtung untersucht.

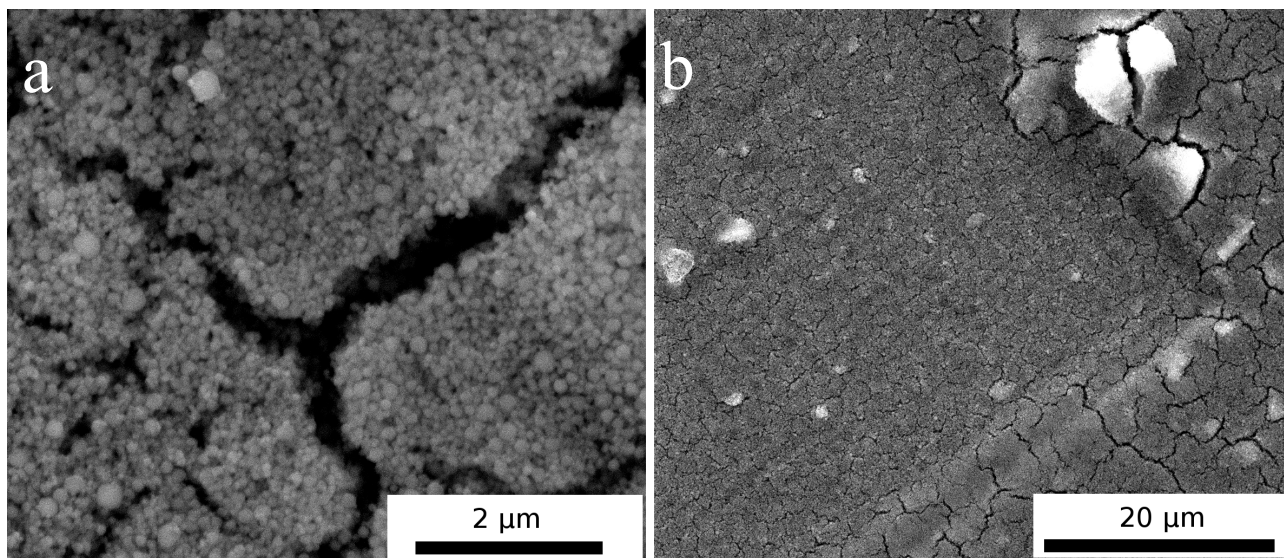


Abbildung 66: REM-Aufnahme eines nanostrukturierten Si-Wafers, beschichtet mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln bei 50 V für 30 s.

Abbildung 66 zeigt die Beschichtung mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln bei

50 V für 30 s. Die Nanostrukturen sind von den Partikeln vollkommen verdeckt. In Aufnahme b ist eine Ecke des strukturierten Feldes noch zu erkennen. Die Beschichtung zeigt an einigen Stellen Risse, die beim Trocknen der Beschichtung entstanden sind. Durch die Funktionalisierung mit PEI haben die Calciumphosphat-Nanopartikel eine hohe positive Oberflächenladung, wodurch sie sich besser abscheiden lassen als die Goldnanopartikel, die nur eine schwache Oberflächenladung aufweisen. Um zunächst den Einfluss der Abscheidespannung und -zeit auf die Beschichtung zu untersuchen, werden unstrukturierte Si-Wafer mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln beschichtet und die Spannung und Zeit variiert.

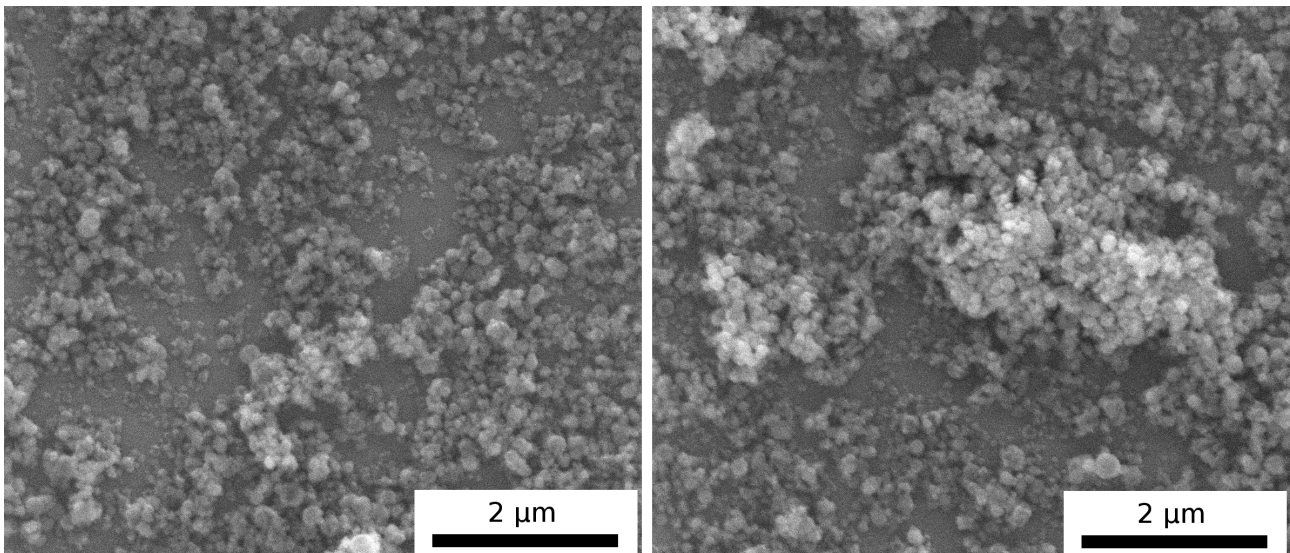


Abbildung 67: REM-Aufnahme eines unstrukturierten Si-Wafers, beschichtet mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln bei 30 V für 30 s.

Die Verringerung der Abscheidespannung auf 30 V bei einer Abscheidezeit von 30 s führt zu deutlich weniger Partikeln, die auf der Oberfläche abgeschieden werden, wie Abbildung 67 zeigt. Allerdings verteilen sich die Partikel nicht gleichmäßig auf der Oberfläche. Die Partikel haben sich zu unterschiedlich großen Aggregaten zusammengeschlossen. An einigen Stellen wurden auch einzelne Partikel abgeschieden, an anderen Stellen wurden überhaupt keine Partikel abgeschieden.



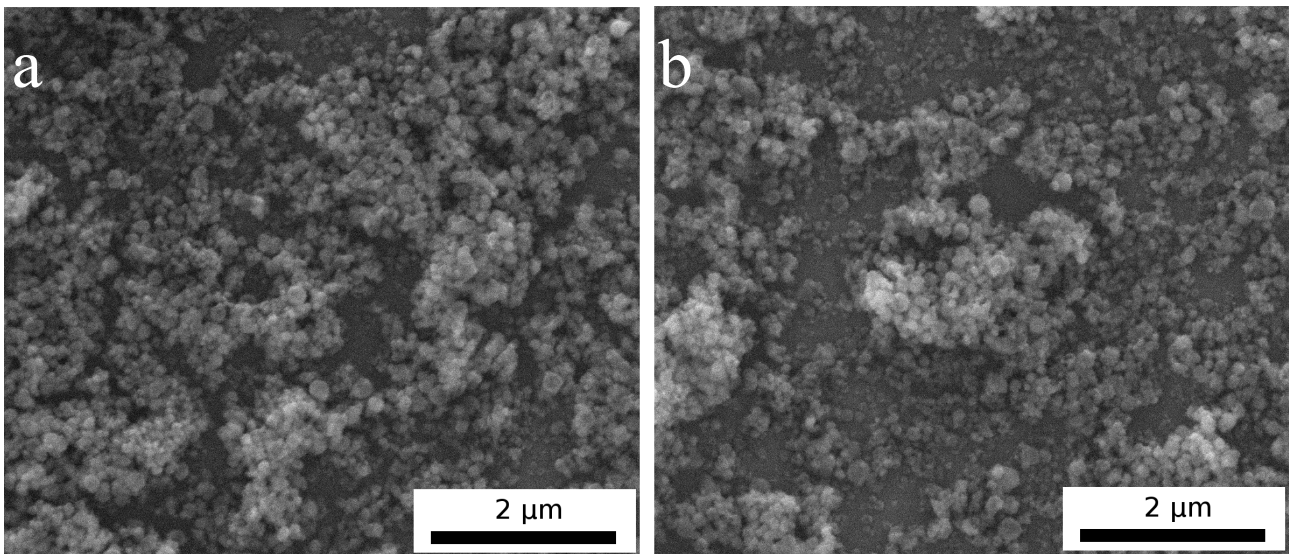


Abbildung 68: REM-Aufnahme eines unstrukturierten Si-Wafers, beschichtet mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln bei 30 V für 60 s.

Abbildung 68 zeigt die Beschichtung eines Si-Wafers bei einer Spannung von 30 V und einer Zeit von 60 s. Durch die höhere Abscheidezeit werden mehr Partikel auf der Oberfläche abgeschieden. Die Verteilung der Partikel hat sich jedoch nicht verändert. Die Partikelaggregate sind durch die höhere Abscheidezeit größer geworden, die Schicht scheint in die Höhe zu wachsen, und es sind immer noch unbeschichtete Bereiche der Oberfläche zu erkennen.

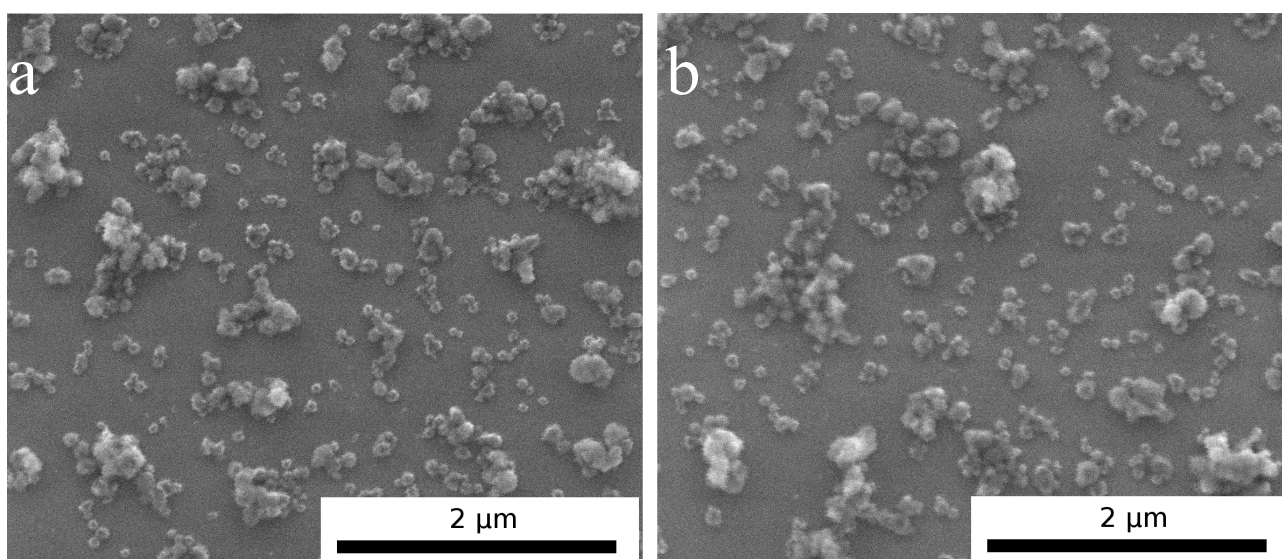


Abbildung 69: REM-Aufnahme eines unstrukturierten Si-Wafers, beschichtet mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln bei 10 V für 30 s.

In Abbildung 69 ist die Beschichtung eines unstrukturierten Si-Wafers bei 10 V für 30 s zu sehen. Die Partikel sind auch bei dieser Spannung noch aggregiert, die Aggregate sind allerdings kleiner, als bei einer Beschichtung bei 30 V. Auch bei 10 V bilden die Partikel Inseln auf der Oberfläche, diese sind jedoch kleiner und bestehen nur aus wenigen Partikeln.

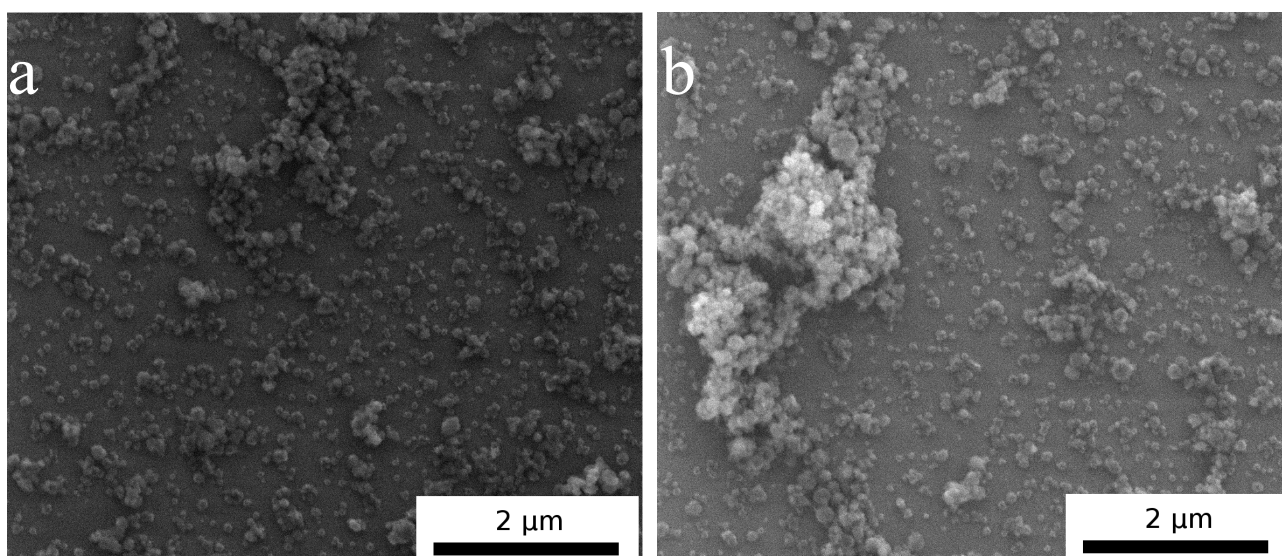


Abbildung 70: REM-Aufnahme eines unstrukturierten Si-Wafers, beschichtet mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln bei 10 V für 60 s.

Die Erhöhung der Abscheidezeit auf 60 s bei einer Spannung von 10 V führt zu einer höheren Menge an Partikeln, die abgeschieden werden (Abbildung 70). Allerdings werden auch hier die Aggregate größer. Verglichen mit den Beschichtungen, die mit einer Spannung von 30 V erhalten wurden, sind die Beschichtungen mit 10 V gleichmäßiger, und die Partikelaggregate auf der Oberfläche sind kleiner geworden.

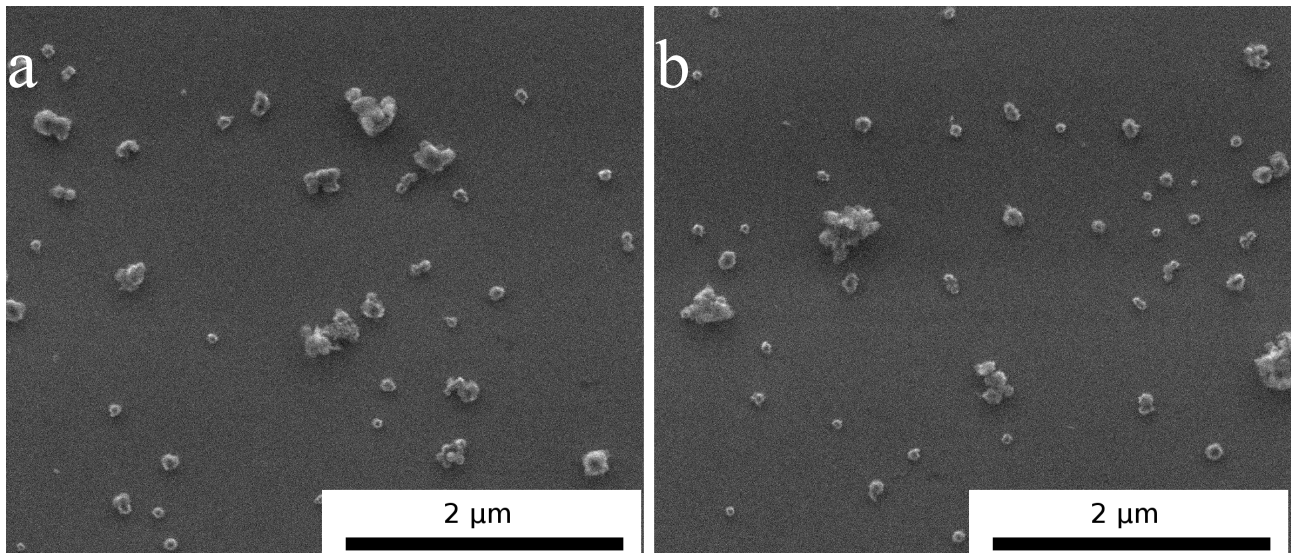


Abbildung 71: REM-Aufnahme eines unstrukturierten Si-Wafers, beschichtet mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln bei 2 V für 30 s.

Wird die Spannung auf 2 V verringert, so werden deutlich weniger Partikel auf der Oberfläche abgeschieden (Abbildung 71). Auch hier bilden die Partikel Aggregate auf der Si-Oberfläche. Einige Partikel sind einzeln auf der Oberfläche abgeschieden worden. Insgesamt ist auch bei 2 V die Verteilung der Partikel unregelmäßig.

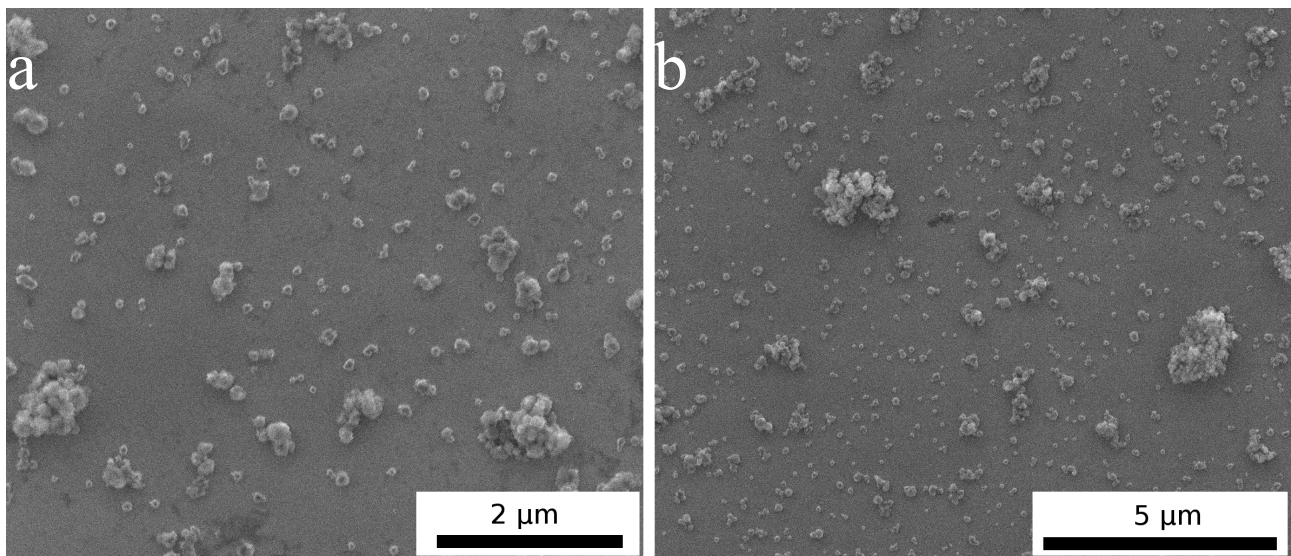


Abbildung 72: REM-Aufnahme eines unstrukturierten Si-Wafers, beschichtet mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln bei 2 V für 60 s.

Die Erhöhung der Abscheidezeit auf 60 s erhöht wieder die Menge an abgeschiedenen Partikeln. Es sind weniger Aggregate zu sehen als bei höheren Spannungen. Die Partikel sind dennoch auch bei dieser niedrigen Spannung ungleichmäßig verteilt.

Die Beschichtung von Si-Oberflächen lässt sich über die Veränderung von Spannung und Abscheidezeit nur ungenügend steuern. Bei höheren Spannungen bilden die Partikel Aggregate, die sich unregelmäßig auf der Oberfläche verteilen. Durch die Verringerung der Spannung wird die Anzahl und Größe der Aggregate verringert, es werden auch einzelne Partikel abgeschieden. Die Menge der abgeschiedenen Partikel kann dann wieder über eine höhere Abscheidezeit erhöht werden, dabei erhöht sich aber auch wieder die Zahl der Partikelaggregate. Auch bei niedrigen Spannungen ist die Verteilung der Partikel auf der Oberfläche unregelmäßig. Die elektrophoretische Beschichtung mit einer Gleichspannung ist nicht geeignet, um eine Oberfläche mit einer Monolage zu beschichten.

### 4.3.6. Abtrennung der überschüssigen Nanopartikel

Da eine Steuerung der Beschichtung über die Variation der Spannung und Abscheide-

zeit nicht möglich ist, wurde versucht, die überschüssigen Partikel im Anschluss an die Beschichtung zu entfernen.

Durch eine Behandlung der Si-Wafer im Ultraschallbad können die elektrophoretisch abgeschiedenen Partikel von der Oberfläche abgelöst werden. Die Nanopartikel, die auf den *ripples* abgeschieden wurden, sind potentiell weniger stark an die Oberfläche gebunden als die Nanopartikel, die in den Gräben abgeschieden wurden. Die schwach gebundenen Partikel werden im Ultraschallbad zuerst abgelöst.

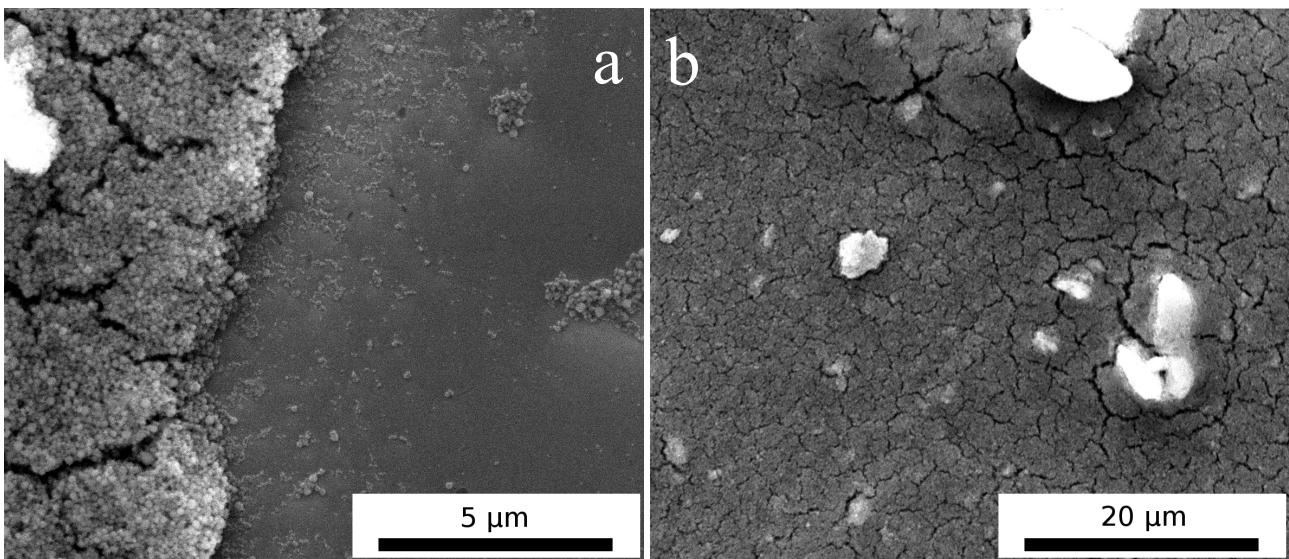


Abbildung 73: Nanostrukturierter Si-Wafer, beschichtet mit Calciumphosphat-Nanopartikeln bei 50 V für 30 s, im Anschluss für 30 s im Ultraschallbad behandelt. Aufnahme a zeigt einen unstrukturierten Bereich, Aufnahme b zeigt einen Teil des strukturierten Bereichs.

In Abbildung 73 ist ein bei 50 V für 30 s beschichteter nanostrukturierter Si-Wafer zu sehen, der nach der elektrophoretischen Beschichtung für 30 s im Ultraschallbad behandelt wurde. In Abbildung 73a ist ein unstrukturierter Bereich des Wafers zu sehen. Hier wurde ein Teil der Partikel fast komplett abgetragen. Nur noch wenige Partikel sind auf diesem Teil des Wafers zu sehen. Daneben ist jedoch auch ein Bereich zu sehen, in dem keine Partikel abgetragen wurden. In Abbildung 73b ist ein Teil des

strukturierten Bereichs des Wafers zu sehen. Hier wurden keine oder nur wenige Partikel abgetragen.

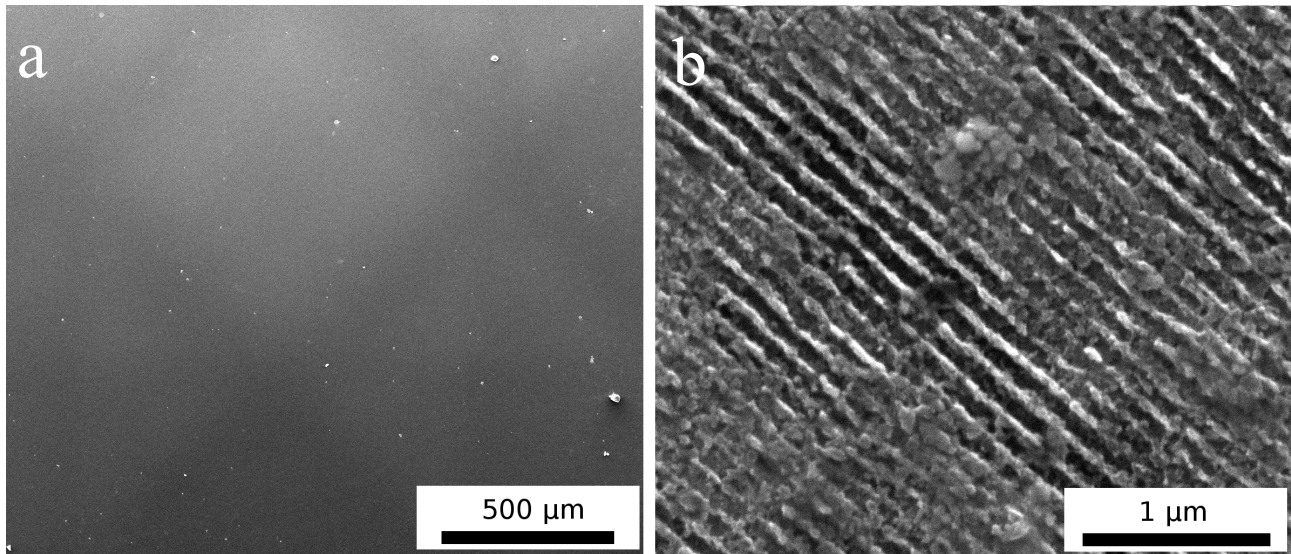


Abbildung 74: Nanostrukturierter Si-Wafer, beschichtet mit Calciumphosphat-Nanopartikeln bei 50 V für 30 s, im Anschluss für 2 min im Ultraschallbad behandelt. Aufnahme a zeigt einen unstrukturierten Bereich, Aufnahme b zeigt einen Teil des strukturierten Bereichs.

Wird die Dauer der Behandlung im Ultraschallbad auf 2 min erhöht, so werden vom gesamten Wafer fast alle Partikel abgetragen, wie in Abbildung 74 zu sehen ist. Abbildung 74a zeigt den unstrukturierten Bereich des Wafers. Hier sind nur noch wenige Partikel auf der Oberfläche zu sehen. Aber auch im strukturierten Bereich, der in Abbildung 74b zu sehen ist, sind nur noch wenige Partikel zu sehen.

Eine andere Möglichkeit, die überschüssigen Partikel von der Oberfläche abzutrennen, ist die Umkehrung der Stromrichtung nach der elektrophoretischen Beschichtung. So können die schwach gebundenen Partikel möglicherweise wieder von der Oberfläche abgetrennt werden, so dass nur die in den Gräben abgeschiedenen Partikel auf der Oberfläche zurück bleiben.



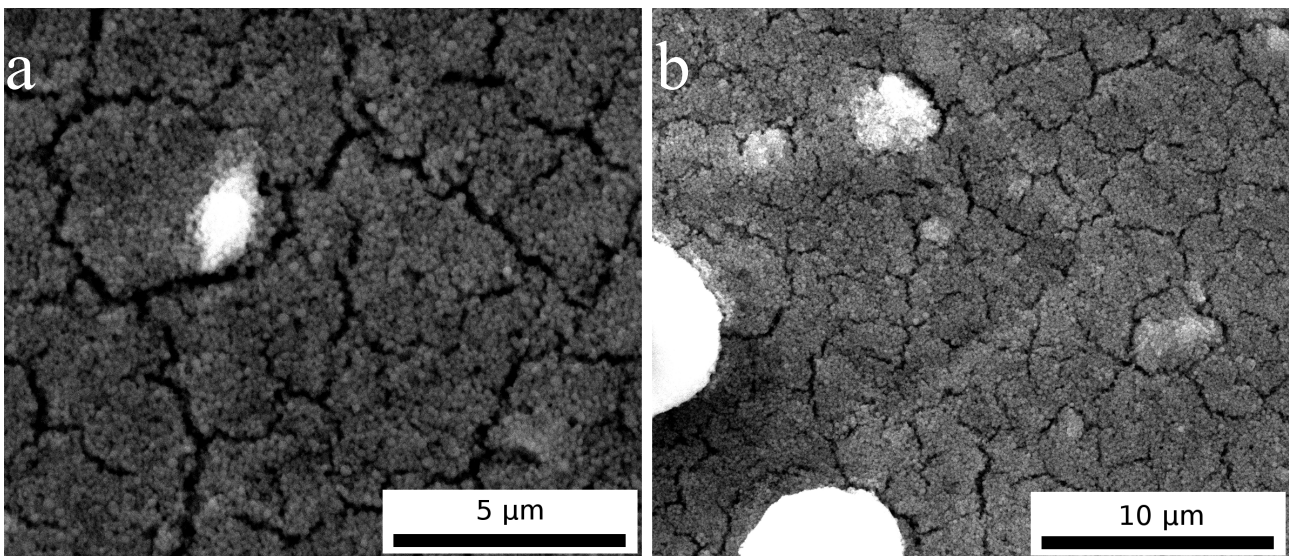


Abbildung 75: Nanostrukturierter Si-Wafer, beschichtet mit Calciumphosphat-Nanopartikeln bei 50 V für 30 s, im Anschluss Umkehr der Stromrichtung und Behandlung bei -50 V für 30 s.

Die REM-Aufnahmen in Abbildung 75 zeigen den nanostrukturierten Si-Wafer nach der Umkehr der Stromrichtung. Man kann erkennen, dass sich die Beschichtung im Vergleich zu Abbildung 66 nicht verändert hat. Die abgeschiedenen Partikel sind auf der Oberfläche offensichtlich stark adsorbiert, so dass auch das Anlegen einer Gegenspannung der gleichen Höhe wie die Abscheidespannung nicht dazu führt, dass die Partikel wieder von der Oberfläche getrennt werden.

Die nachträgliche Abtrennung von überschüssigen Partikeln von der Oberfläche gestaltet sich schwierig. Durch eine Behandlung mit Ultraschall lassen sich die Partikel von der Oberfläche trennen, wobei die Steuerung dieser Abtrennung jedoch schwierig ist. Auch durch das Anlegen einer Gegenspannung konnten die überschüssigen Partikel nicht entfernt werden. Selbst bei einer hohen Gegenspannung zeigte sich keine Veränderung der Partikelschicht auf der Oberfläche.

### **4.3.7. Elektrophoretische Beschichtung mit einer Mischspannung und bei erhöhter Dispersionstemperatur**

Obwohl das Anlegen einer Gegenspannung im Anschluss an die elektrophoretische Beschichtung nicht erfolgreich war, kann eine Umkehrung der Stromrichtung während der Beschichtung dazu führen, dass die Partikel gezielt in den Gräben abgeschieden werden. Die Verwendung einer normalen Wechselspannung ist aber nicht sinnvoll, da bei einer Wechselspannung der zeitliche Mittelwert 0 V beträgt und die Partikel durch das elektrische Feld im zeitlichen Mittel nicht bewegt werden. Wird die Wechselspannung jedoch mit einer Gleichspannung überlagert, so verschiebt sich die gesamte Wechselspannungskurve um den Gleichspannungsanteil nach oben und man erhält eine sogenannte Mischspannung.



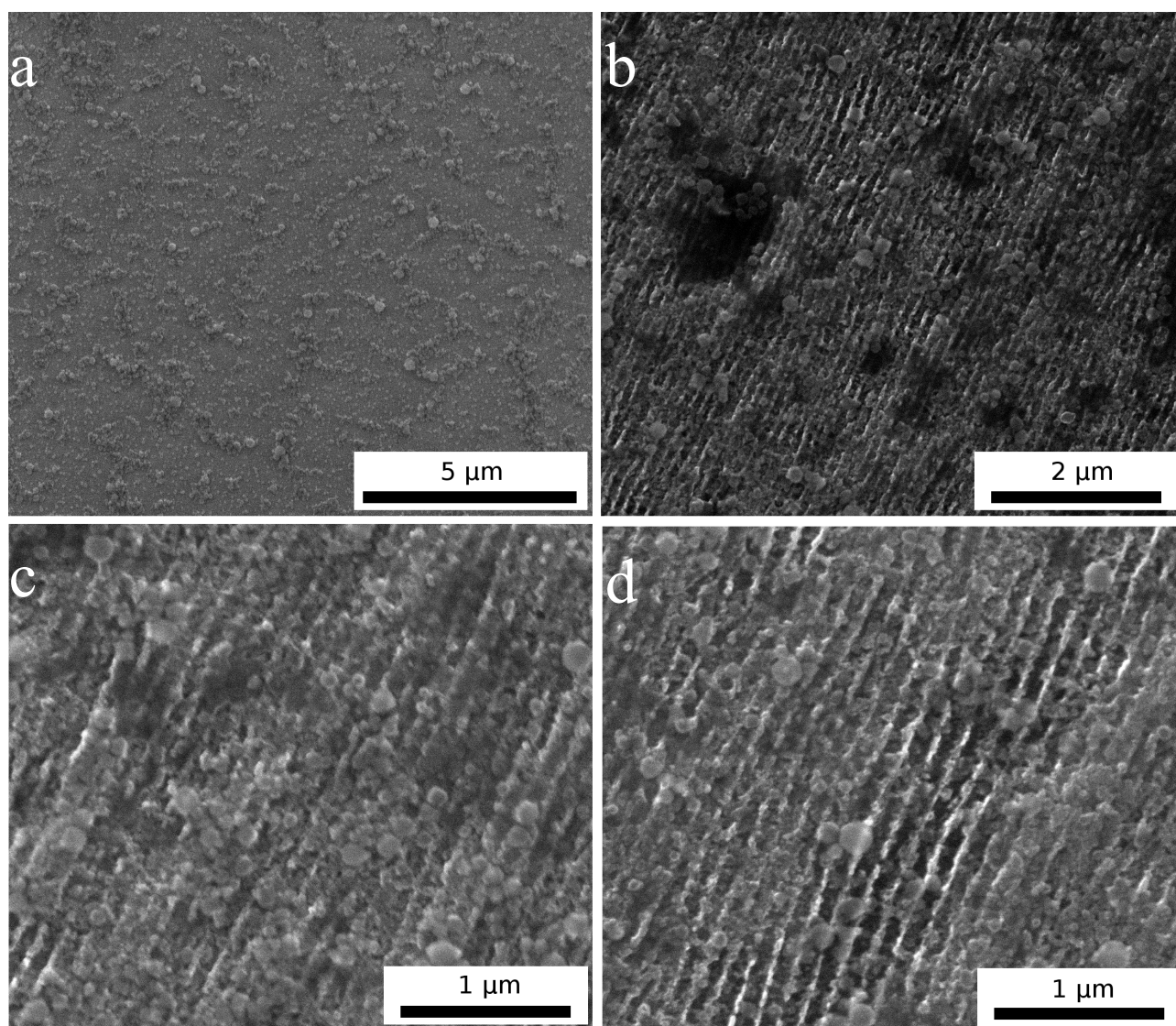


Abbildung 76: Nanostrukturierter Si-Wafer, beschichtet mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln, abgeschieden mit einer Mischspannung aus 5 V Gleichspannung und 10 V Wechselspannung für 30 s.

Abbildung 76 zeigt einen nanostrukturierten Si-Wafer, der elektrophoretisch mit einer Mischspannung beschichtet wurde. Die Mischspannung besteht aus 5 V Gleichspannung und 10 V Wechselspannung mit einer Frequenz von 50 Hz, so dass die Spannung zwischen -5 V und +15 V wechselt. Abbildung 76a zeigt einen unstrukturierten Bereich des Wafers. Hier sind im Vergleich mit Abbildung 69 einige Unterschiede zu erkennen. Die Partikel sind besser auf der Oberfläche verteilt und haben kleinere Ag-

gregate gebildet. Im strukturierten Bereich scheinen weniger Partikel abgeschieden worden zu sein. Diese zeigen aber eine gewisse Lokalisierung in den Nanostrukturen. Einige Partikel sind zu groß und passen nicht in die Vertiefungen, und einige Partikel haben kleinere Aggregate gebildet. Es sind aber auch Partikel zu erkennen, die sich in den Vertiefungen aufgereiht haben. Die Aufnahmen zeigen zudem, dass es bei der elektrophoretischen Beschichtung einen Unterschied zwischen strukturierten und unstrukturierten Bereichen gibt. Dies könnte am etwas höheren Abstand des strukturierten Bereichs zur Gegenelektrode liegen, wahrscheinlicher ist aber, dass durch die *ripples* der Stromfluss zwischen den beiden Elektroden verändert wird, so dass im strukturierten Bereich Potentialunterschiede herrschen, die sich durch eine geringere Menge abgeschiedener Partikel bemerkbar machen.

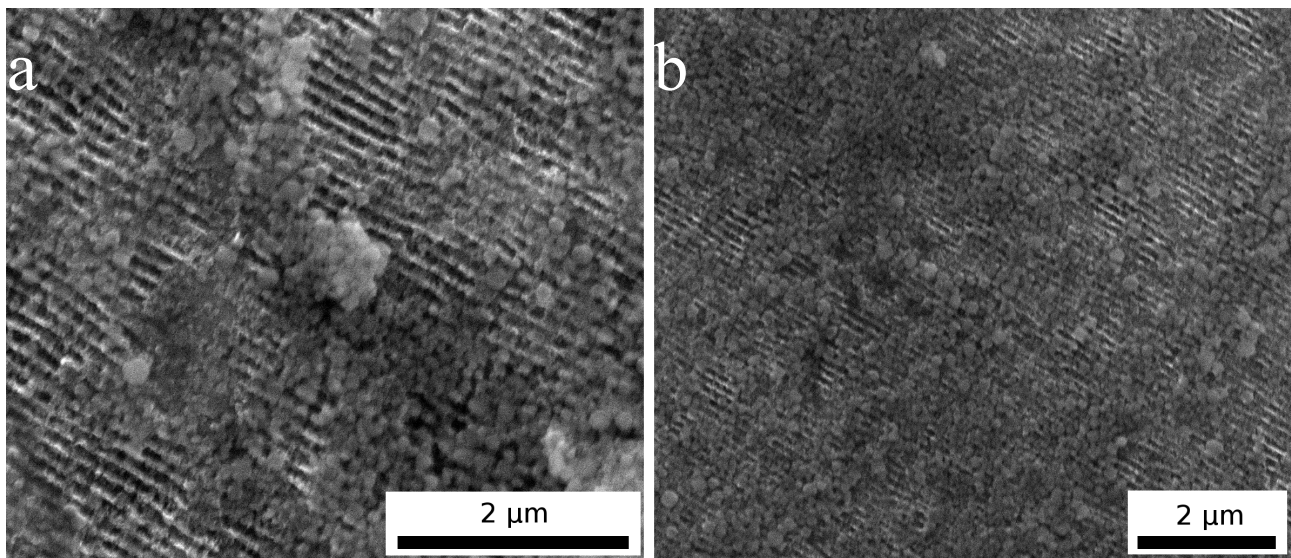


Abbildung 77: Nanostrukturierter Si-Wafer, beschichtet mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln, abgeschieden bei 10 V Gleichspannung für 30 s.

Zum besseren Vergleich wurde ein nanostrukturierter Si-Wafer mit einer vergleichbaren Gleichspannung beschichtet. Abbildung 77 zeigt, dass bei der Verwendung von Gleichspannung mehr Partikel im strukturierten Bereich abgeschieden wurden als bei der Verwendung der Mischspannung. Diese Partikel sind allerdings stärker aggregiert und verdecken die Strukturen teilweise.

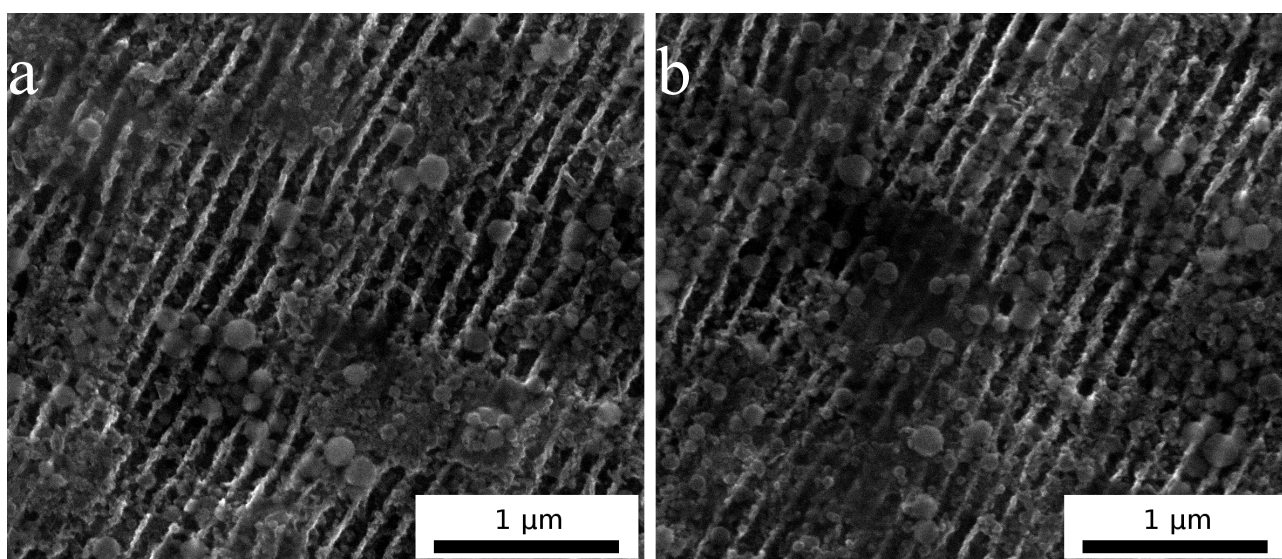


Abbildung 78: Nanostrukturierter Si-Wafer, beschichtet mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln, abgeschieden mit einer Mischspannung aus 5 V Gleichspannung und 10 V Wechselspannung für 60 s.

Eine höhere Abscheidezeit scheint bei der Verwendung einer Mischspannung keinen großen Einfluss auf die Beschichtung des strukturierten Bereichs zu haben, wie Abbildung 78 zeigt. Es sind einige größere Partikel zu erkennen, wobei auch hier Partikel in den Vertiefungen abgeschieden worden sind. Durch die Erhöhung der Abscheidezeit haben sich keine größeren Partikelaggregate gebildet.

Auch eine höhere Dispersionstemperatur kann die Orientierung der Partikel an den Nanostrukturen verbessern. Durch eine höhere Temperatur haben die Partikel eine höhere kinetische Energie. Die schwach an der Oberfläche gebundenen Partikel können sich wieder ablösen und in den Gräben abgeschieden werden.

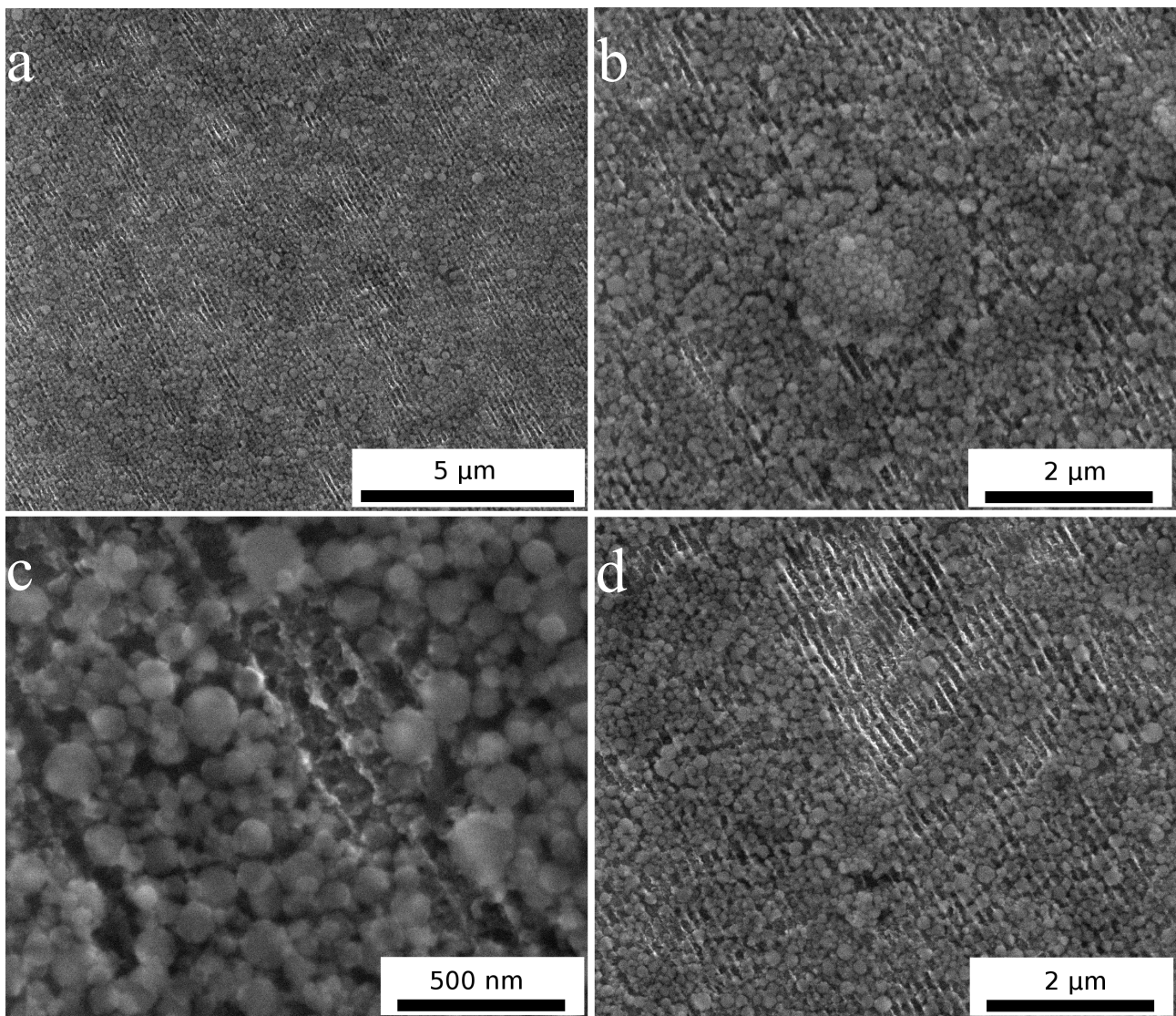


Abbildung 79: Nanostrukturierte Si-Wafer, beschichtet mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln, abgeschieden bei einer Dispersionstemperatur von 50 °C bei 10 V für 30 s.

Die Abscheidung bei erhöhter Dispersionstemperatur führt zu einer größeren Menge Partikeln, die auf der Oberfläche abgeschieden wurden. Die Partikel sind gleichmäßig verteilt, und nur an einer Stelle hat sich ein größeres Aggregat gebildet. Eine Positionierung der Partikel innerhalb der Nanostrukturen ist zu erkennen.



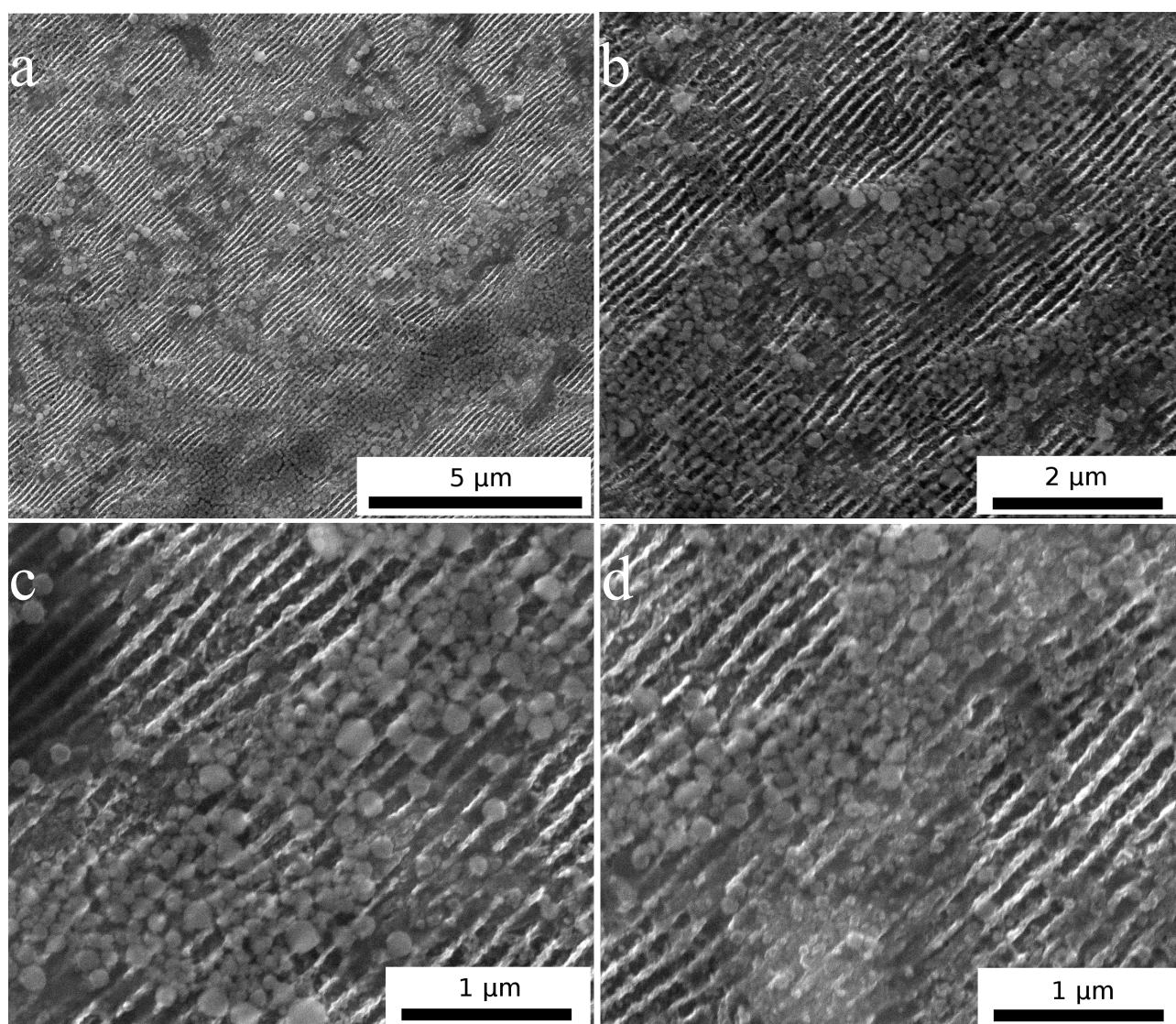


Abbildung 80: Nanostrukturierte Si-Wafer, beschichtet mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln, abgeschieden bei einer Dispersionstemperatur von 70 °C bei 10 V für 30 s.

Eine weitere Erhöhung der Dispersionstemperatur auf 70 °C führt zu einer geringeren Beschichtung der Wafer. Die Partikel sind nicht mehr auf der Oberfläche verteilt, sondern wurden in Strängen auf der Oberfläche abgeschieden. Die Partikel wurden trotzdem (im Gegensatz zur Beschichtung bei Raumtemperatur) nur in einer Schicht abgeschieden und haben sich nicht überlagert. Bei dieser Temperatur ist die kinetische Energie der Partikel zu groß, so dass insgesamt weniger Partikel abgeschieden wur-

den.

Sowohl die mit einer Mischspannung abgeschiedenen Schichten als auch die bei erhöhter Dispersionstemperatur abgeschiedenen Schichten weisen eine Lokalisierung bezüglich der Nanostrukturen auf. Eine Kombination dieser beiden Methoden könnte die Lokalisierung der abgeschiedenen Partikel verbessern. Durch die Mischspannung kann die Aggregation der Partikel auf der Oberfläche verhindert werden, und durch die Erhöhung der Dispersionstemperatur kann die Menge der abgeschiedenen Partikel erhöht werden.

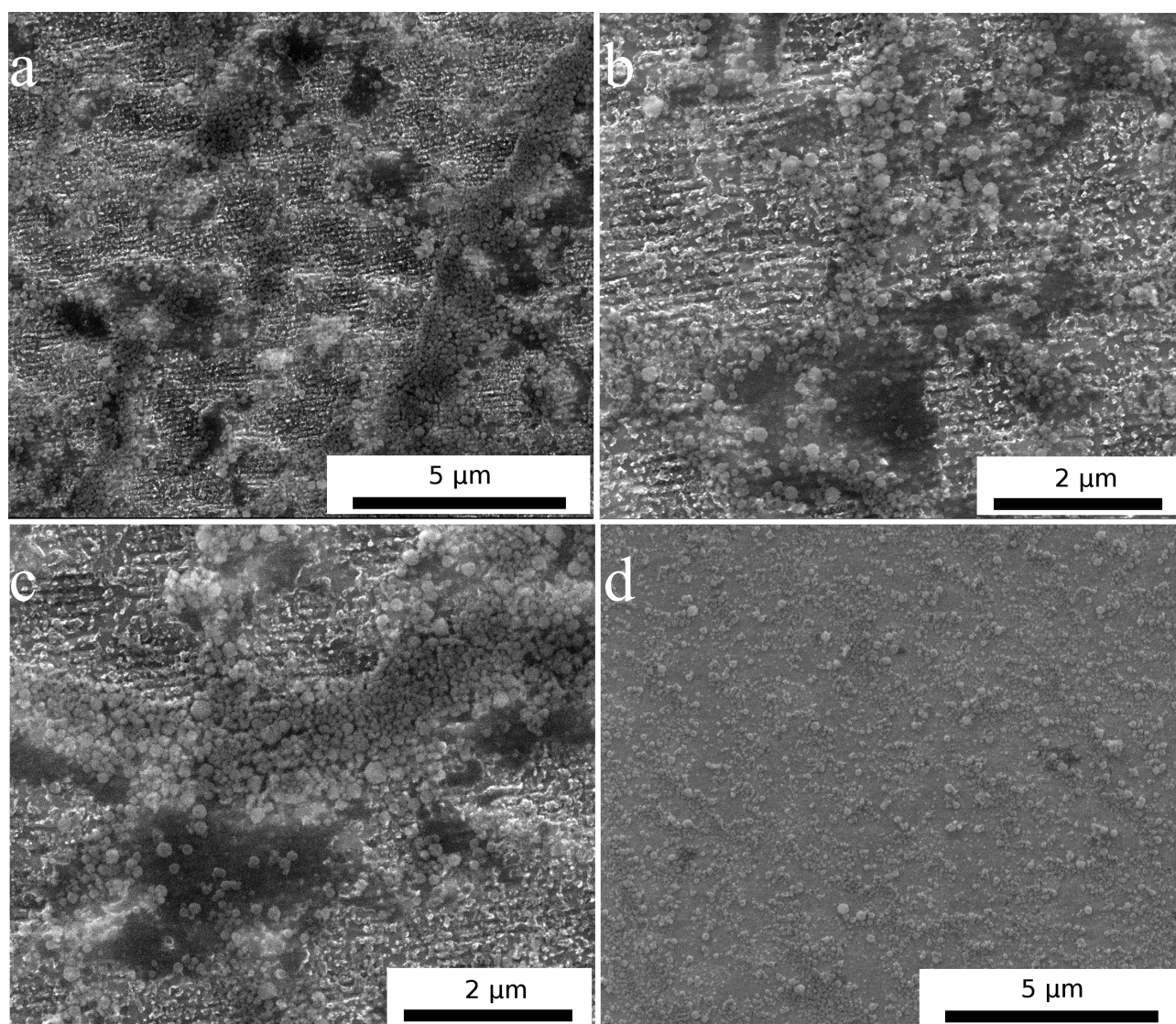


Abbildung 81: Nanostrukturierte Si-Wafer, beschichtet mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln, abgeschieden bei einer Dispersionstemperatur von 50 °C bei einer Mischspannung aus 5 V Gleichspannung und 10 V Wechselspannung für 30 s.

Abbildung 81 zeigt einen nanostrukturierten Si-Wafer, der mit einer Mischspannung und erhöhter Dispersionstemperatur beschichtet wurde. Im Vergleich zum Wafer, der nur mit einer Mischspannung beschichtet wurde (Abbildung 76), sind durch die erhöhte Dispersionstemperatur mehr Partikel abgeschieden worden. Die Partikel sind jedoch nicht gleichmäßig verteilt. Die Schicht besteht zwar nur aus einer Schicht an Partikeln, diese haben jedoch Inseln gebildet, die voneinander isoliert auf der Ober-

fläche abgeschieden wurden.

Für eine Berechnung der Menge abgeschiedener Partikel muss beachtet werden dass die verwendete Spannung asymmetrisch ist. Die Spannung variiert zwischen -5 V und +15 V, so dass sich die Partikel im zeitlichen Mittel stärker in Richtung des Si-Wafers bewegen, als dass sie sich vom Si-Wafer wegbewegen. Um die Anzahl der abgeschiedenen Partikel zu berechnen muss also zunächst der Effektivwert der Mischspannung berechnet werden. Der Effektivwert ist der quadratische Mittelwert der Mischspannung. Der Effektivwert ergibt sich aus:

$$U_{\text{Eff}} = \sqrt{(U_{\text{.}})^2 + (U_{\text{~}})^2} = \sqrt{(U_{\text{.}})^2 + \left(\frac{1}{\sqrt{2}} \hat{u}\right)^2} \quad (6)$$

mit

$U_{\text{.}}$  = Gleichspannung

$\hat{u}$  = Scheitelwert der Wechselspannung

Daraus ergibt sich ein Effektivwert von 8,66 V.

Das Zetapotential wird über die elektrophoretische Mobilität  $\mu_e$  bestimmt, daher erhält man diese aus den Zetapotentialmessungen. Für die Calciumphosphat-PEI-Nanopartikel ergibt sich aus mehreren Messungen eine durchschnittliche elektrophoretische Mobilität von  $2,97 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ Vs}$  in Wasser. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel lässt sich dann berechnen aus:

$$v = \mu_e E \quad (7)$$

Für die Berechnung der elektrischen Feldstärke wird angenommen, dass sich Kathode



und Anode wie zwei Kondensatorplatten verhalten. Dann ist die Feldstärke der Quotient aus Spannung und Abstand der Kondensatorplatten. Daraus ergibt sich bei einer Effektivspannung von 8,66 V und einem Plattenabstand von 0,00428 m eine Wandergeschwindigkeit von  $6 \cdot 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ . Bei einer Abscheidezeit von 30 s wandern die Partikel 0,18 cm. Die für die elektrophoretische Abscheidung verwendeten Si-Wafer sind  $1 \text{ cm}^2$  groß, damit ergibt sich für die Abscheidung ein Volumen von  $0,18 \text{ cm}^3$ , aus dem die Partikel in 30 s den Si-Wafer erreichen können. In diesem Volumen befinden sich 0,18 mg Partikel. Mit einer Dichte von  $3,2 \text{ g cm}^{-3}$  und einem durchschnittlichen Durchmesser von 80 nm befinden sich in diesem Volumen  $2,62 \cdot 10^{10}$  Partikel, die auf der Oberfläche des Wafers abgeschieden werden können. Im strukturierten Bereich mit einer Kantenlänge von  $230 \text{ }\mu\text{m}$  können in 30 s 139000 Partikel abgeschieden werden. Pro  $\mu\text{m}^2$  ergibt sich für eine Abscheidezeit von 30 s eine Partikelanzahl von 604 Partikeln  $\mu\text{m}^{-2}$ . Ein Vergleich mit Abbildung 76 zeigt, dass diese Berechnung eine höhere Partikelanzahl pro  $\mu\text{m}^2$  angibt als tatsächlich abgeschieden werden.

Diese Diskrepanz zwischen Berechnung und Experiment lässt sich mit zahlreichen fehlerhaften Annahmen begründen. So wurde die elektrophoretische Mobilität in wässrigen Dispersionen bestimmt und nicht in 2-Propanol, der Plattenabstand wird im Experiment mit der Hand eingestellt und ist demnach fehlerbehaftet und für die Berechnung der Partikelanzahl wurde die Dichte von Hydroxylapatit verwendet, während die Nanopartikel wahrscheinlich eine geringere Dichte haben. Außerdem lassen sich keine Aussagen über die Anzahl an Partikeln treffen, die sich während der Abscheidung wieder von der Si-Oberfläche lösen.

### 4.3.8. Funktionalisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel mit fluoreszierendem Polyethylenimin

Um die Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Übertragung auf das Alginatgel visualisieren zu können, ist ein Elektronenmikroskop nicht geeignet, da die Probenkammer evakuiert werden muss. Dadurch trocknet das Gel vollständig aus und die Struktur wird zerstört. Auch bei einer vorsichtigen Trocknung des Gels kann man nicht sicher sein, dass die Struktur erhalten bleibt. Für ein gewöhnliches Lichtmikroskop sind die Nanostrukturen zu klein und können nicht aufgelöst werden. Deswegen wurden die Calciumphosphat-Nanopartikel mit einem fluoreszierenden Polymer (PEI) funktionalisiert, so dass die Partikel und damit auch die auf das Gel übertragenen Nanostrukturen im Fluoreszenzmikroskop untersucht werden konnten. Das PEI hat ein Molekulargewicht von  $25000 \text{ g mol}^{-1}$  und ist mit dem Farbstoff Rhodamin B markiert.

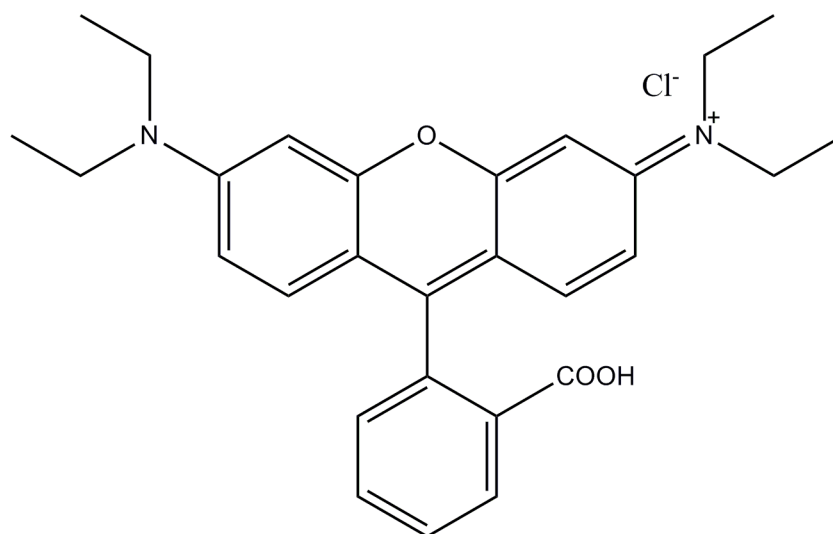


Abbildung 82: Struktur von Rhodamin B.

Die Anzahl der am Polymer gebundenen Farbstoffmoleküle wird vom Hersteller mit einem Stoffmengenverhältnis Monomer zu Farbstoff von 380:1 angegeben.

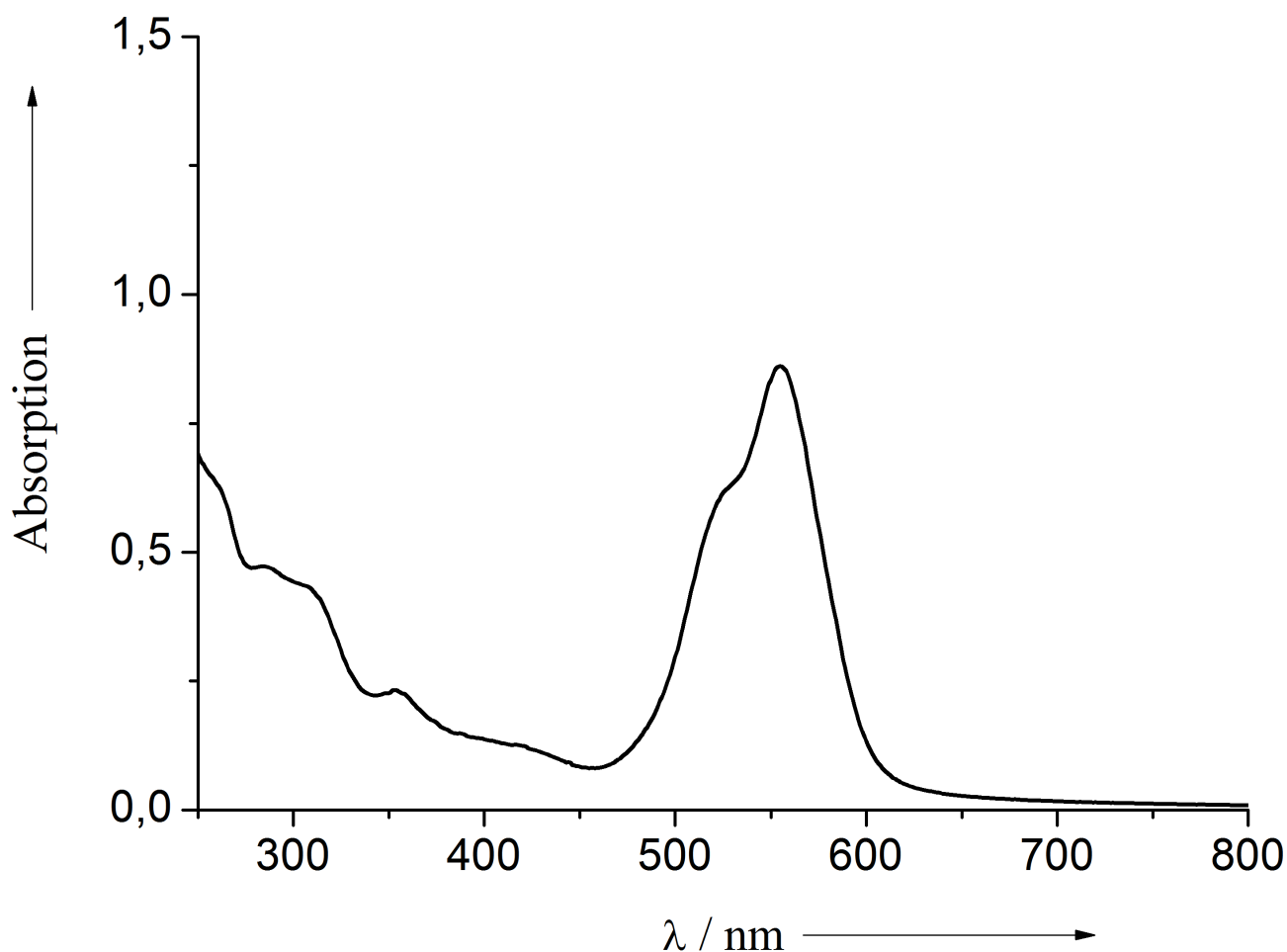


Abbildung 83: UV/Vis-Spektrum von Rhodamin B-markiertem Polyethylenimin.

Das Absorptionsspektrum zeigt die typischen Absorptionsbanden von Rhodamin B (Abbildung 83).<sup>[144]</sup> Die größte Absorption liegt zwischen 500 nm und 600 nm, mit einem Maximum bei 555 nm und einer Schulter bei 525 nm. Unterhalb einer Wellenlänge von 400 nm zeigen sich noch weitere kleine Absorptionsbanden bei 354 nm, 310 nm, 285 nm und 261 nm.

Da die Fluoreszenz von Rhodamin B schon bei geringen Konzentrationen einem Konzentrationsquenching unterliegt,<sup>[145, 146]</sup> wurde die PEI-Rhodamin-Lösung mit PEI-Lösung verdünnt, und über Fluoreszenzmessungen wurde der optimale Verdünnungsgrad gesucht.

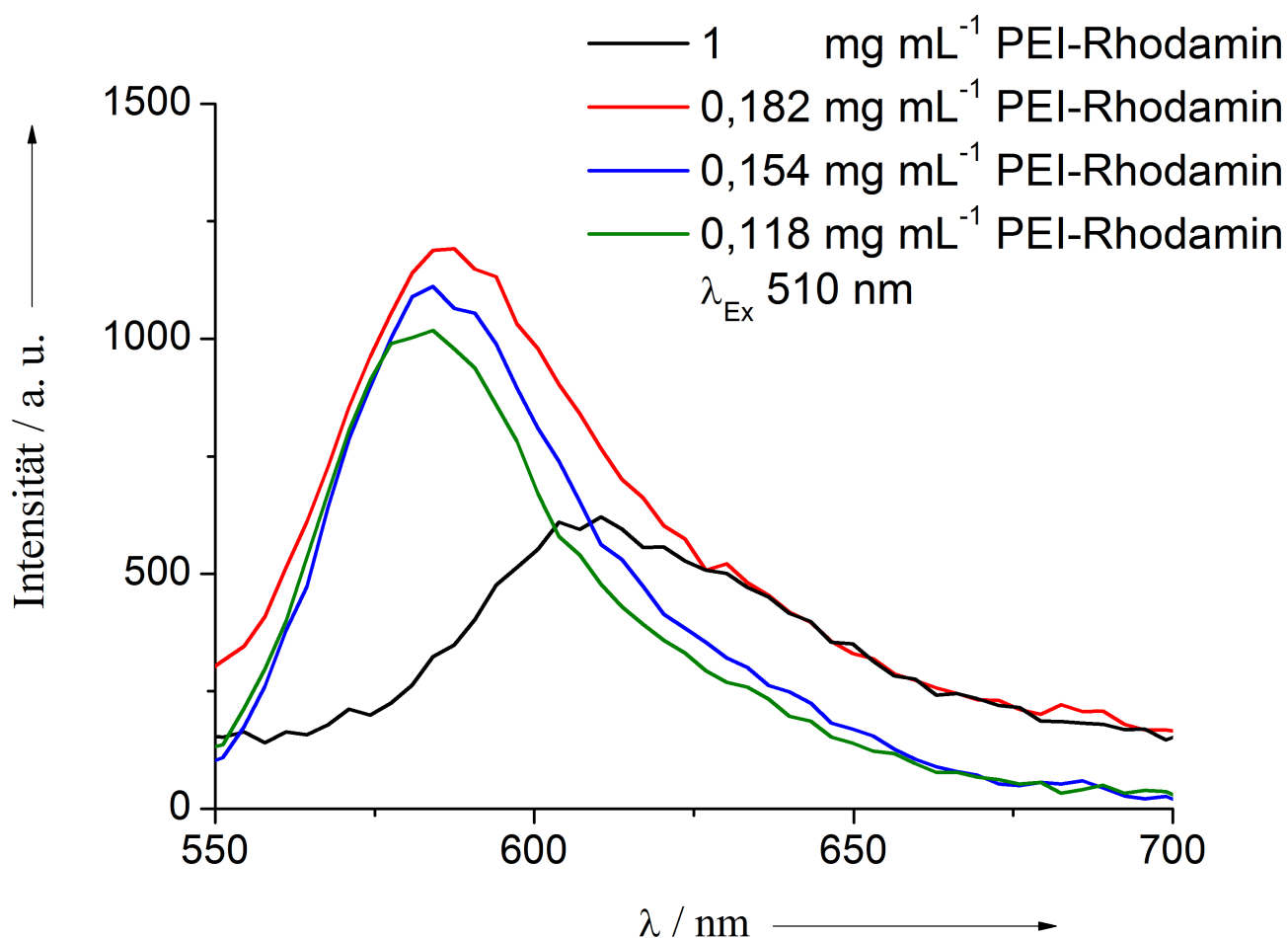


Abbildung 84: Fluoreszenzspektren von PEI-Rhodamin bei verschiedenen Verdünnungen. Die PEI-Gesamtkonzentration betrug immer 2 mg mL<sup>-1</sup>

Abbildung 84 zeigt die Fluoreszenzspektren der PEI-Rhodamin-Lösung bei verschiedenen Verdünnungen. Die Fluoreszenz wurde mit einer Wellenlänge von 510 nm angeregt. Die Fluoreszenzbande des Rhodamins ist sehr breit. Durch die Verdünnung verschiebt sich das Maximum von 610 nm bei der unverdünnten Lösung auf 585 nm bei den verdünnten Lösungen. Dies liegt am unterschiedlichen pH-Wert der Lösungen. Die unverdünnte PEI-Rhodamin-Lösung hat einen pH-Wert von 7, wohingegen die normale PEI-Lösung einen pH-Wert von 10 aufweist. Durch die starke Verdünnung der PEI-Rhodamin-Lösung mit der normalen PEI-Lösung hat das Gemisch ebenfalls einen pH-Wert von 10. Bei diesem pH-Wert wird die Carboxylgruppe des

Rhodamins deprotoniert, so dass das Rhodamin als Zwitterion vorliegt, wodurch sich die Fluoreszenzbande verschiebt. Die Fluoreszenzintensität wurde durch die Verdünnung gesteigert. Bei einer zehnfachen Verdünnung wird die Intensität verdoppelt. Eine weitere Verdünnung der Lösung führt aufgrund der geringeren Aktivatorkonzentration wieder zu einer geringeren Fluoreszenzintensität, der Unterschied ist aber sehr gering. Zur Funktionalisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel wurde eine PEI-Rhodamin-Konzentration von  $0,118 \text{ mg mL}^{-1}$  verwendet.



Abbildung 85: Vergleich der verdünnten PEI-Rhodamin-Lösung (jeweils linke Küvette) mit der konzentrierten PEI-Rhodamin-Lösung (jeweils rechte Küvette) im Tageslicht (linkes Bild) und unter UV-Licht (rechtes Bild).

Mit dem bloßen Auge sieht man einen geringen Unterschied zwischen den Fluoreszenzintensitäten der unverdünnten und der verdünnten PEI-Rhodamin-Lösung. Allerdings kann das UV-Licht die konzentrierte PEI-Rhodamin-Lösung nicht vollständig durchdringen, so dass die Fluoreszenz lediglich am oberen Rand der Küvette zu beobachten ist.

Für die Synthese der mit PEI-Rhodamin funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden 85 mL Calcium-*L*-lactat-Lösung (18 mM; pH = 9) und 85 mL *di*-Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung (10,8 mM; pH = 9) über eine Peristaltikpum-

pe gemischt. Über eine zweite Peristaltikpumpe wurden 170 mL der verdünnten PEI-Rhodamin-Lösung ( $0,118 \text{ mg mL}^{-1}$  PEI-Rhodamin;  $\text{pH} = 10$ ) zugegeben. Im Anschluss wurde die Dispersion für 60 Minuten bei 2540 g zentrifugiert. Die Partikel wurden zweimal mit Wasser gewaschen und anschließend gefriergetrocknet. Für die elektrophoretische Abscheidung wurden die Partikel in 2-Propanol redispergiert.

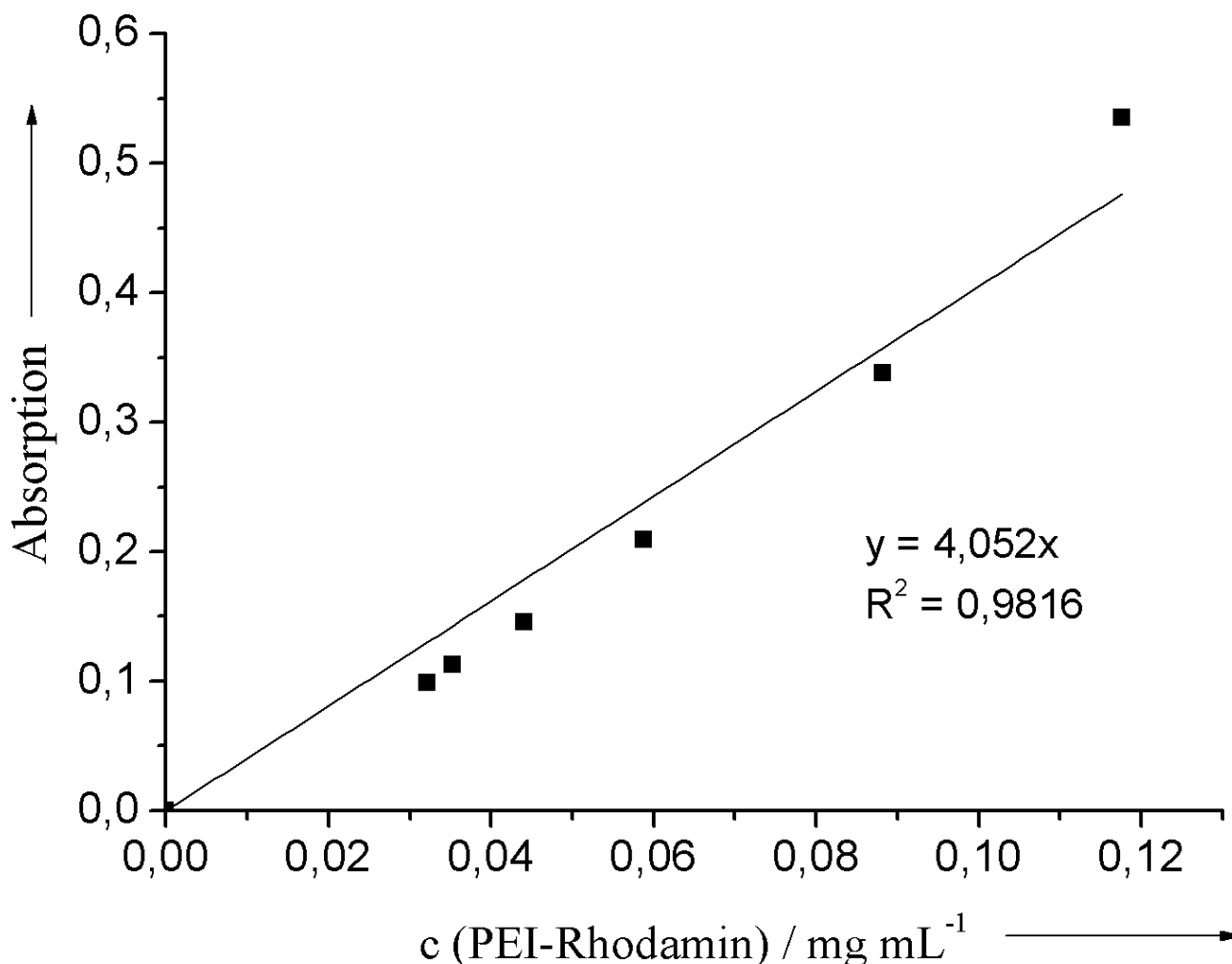


Abbildung 86: Kalibrationsgerade zur Bestimmung der Konzentration des an Calciumphosphat-Nanopartikeln adsorbierten PEI-Rhodamins. Alle Lösungen hatten einen pH-Wert von 10.

Um das an der Partikeloberfläche adsorbierte PEI-Rhodamin quantitativ zu bestimmen, wird aus den Absorptionsspektren von PEI-Rhodamin-Lösungen unterschiedli-

cher Konzentration eine Kalibrationsgerade erstellt. Hierfür wird das Absorptionsmaximum bei 555 nm verwendet. Als Stammlösung wird eine PEI-Lösung mit  $0,118 \text{ mg mL}^{-1}$  PEI-Rhodamin verwendet. Durch eine Verdünnung der Stammlösung mit normaler PEI-Lösung werden die unterschiedlich konzentrierten Lösungen für die Kalibrationsgerade hergestellt. Da die Stammlösung den gleichen pH-Wert wie die normale PEI-Lösung aufweist bleibt er bei weiterer Verdünnung konstant und hat keinen Einfluss auf die Kalibrationsgerade.

Aus der Kalibrationsgerade ergibt sich, dass an der Partikeloberfläche von 1 mg Calciumphosphat-Nanopartikeln eine PEI-Rhodamin-Menge von 0,017 mg adsorbiert wurde. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die Partikeldispersion einen pH-Wert von 7 hat, so dass die Konzentrationsbestimmung durch den veränderten pH-Wert fehlerbehaftet sein kann.

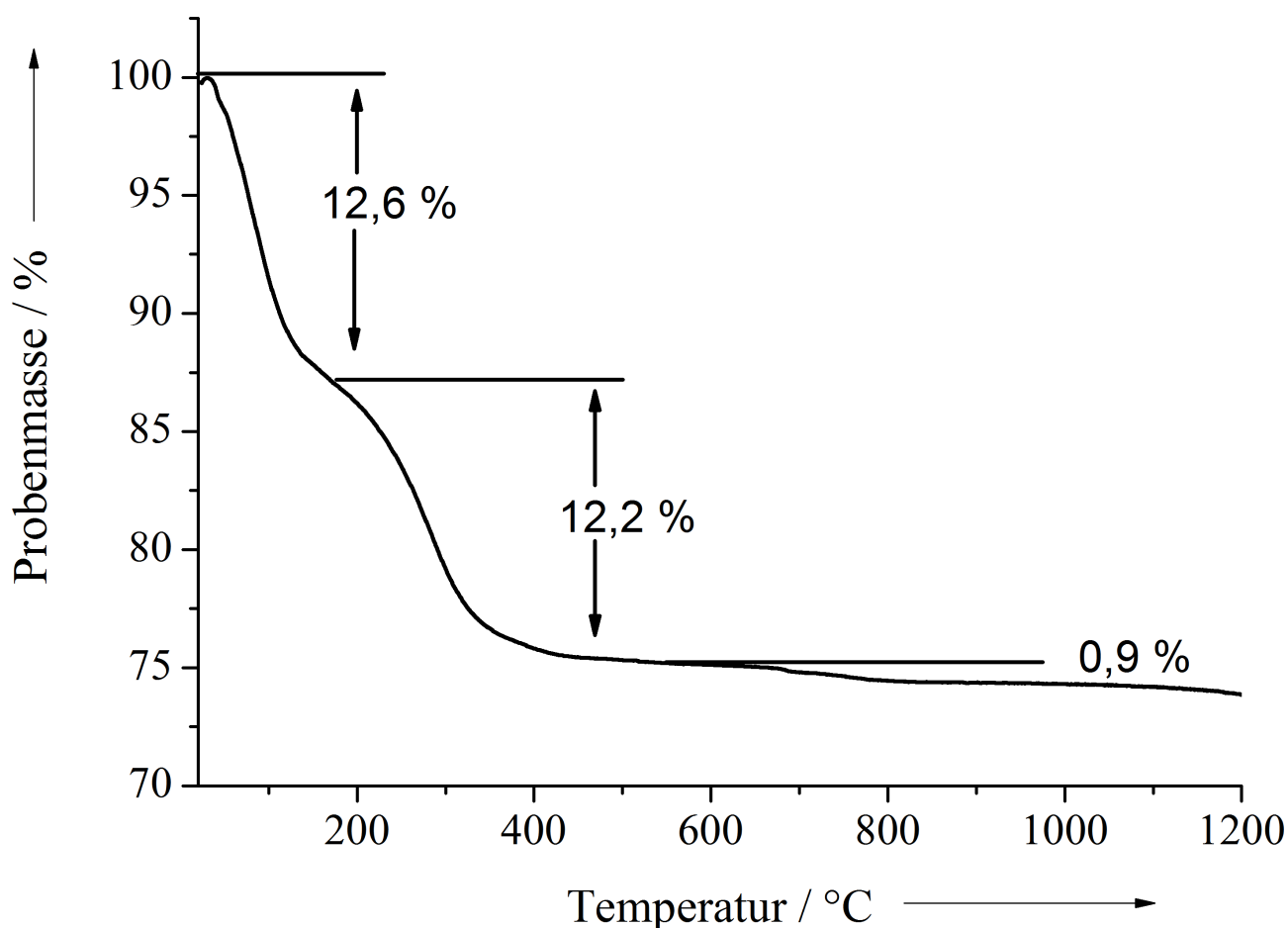


Abbildung 87: Thermogramm der PEI-Rhodamin-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel, gemessen in einer Sauerstoffatmosphäre ( $50 \text{ mL min}^{-1}$ ) mit einer Heizrate von  $1 \text{ K min}^{-1}$ .

Auch bei diesen Partikeln sind im Thermogramm drei Massenverluststufen zu sehen. Die erste Stufe mit einem Massenverlust von 12,6 Gew.-% ist auf den Verlust von in den Partikeln eingelagertem Wasser zurückzuführen. Direkt an die erste Stufe schließt sich die Verbrennung des Polymers an. Hier verbrennen 12,2 Gew.-%. Im Vergleich zur Funktionalisierung mit normaler PEI-Lösung sind hier 4 Gew.-% weniger Polymer an der Partikeloberfläche adsorbiert. Dies ist auf die veränderte Synthese zurückzuführen. Durch das schnelle Mischen der Lösungen kann sich weniger Polymer in die Partikel einlagern und durch die Zentrifugation wird eventuell schwach adsorbier-



tes Polymer wieder von der Partikeloberfläche abgelöst. Die dritte Stufe zeigt einen Massenverlust von 0,9 Gew.-%. Es wird bei diesen Partikeln also auch weniger CO<sub>2</sub> freigesetzt. Dies ist ebenfalls auf die schnelle Synthese zurückzuführen, wodurch sich weniger Carbonat in die Partikel einlagern konnte.

Aus dem Thermogramm ist ersichtlich, dass an der Partikeloberfläche von 1 mg Partikeln insgesamt 0,122 mg PEI adsorbiert. Davon sind 0,017 mg PEI-Rhodamin. Dies sind 14 % des gesamten PEI-Gehalts. In der Stammlösung befanden sich 5,9 % PEI-Rhodamin, d. h. dass mehr PEI-Rhodamin an der Partikeloberfläche adsorbiert wurde als normales PEI.

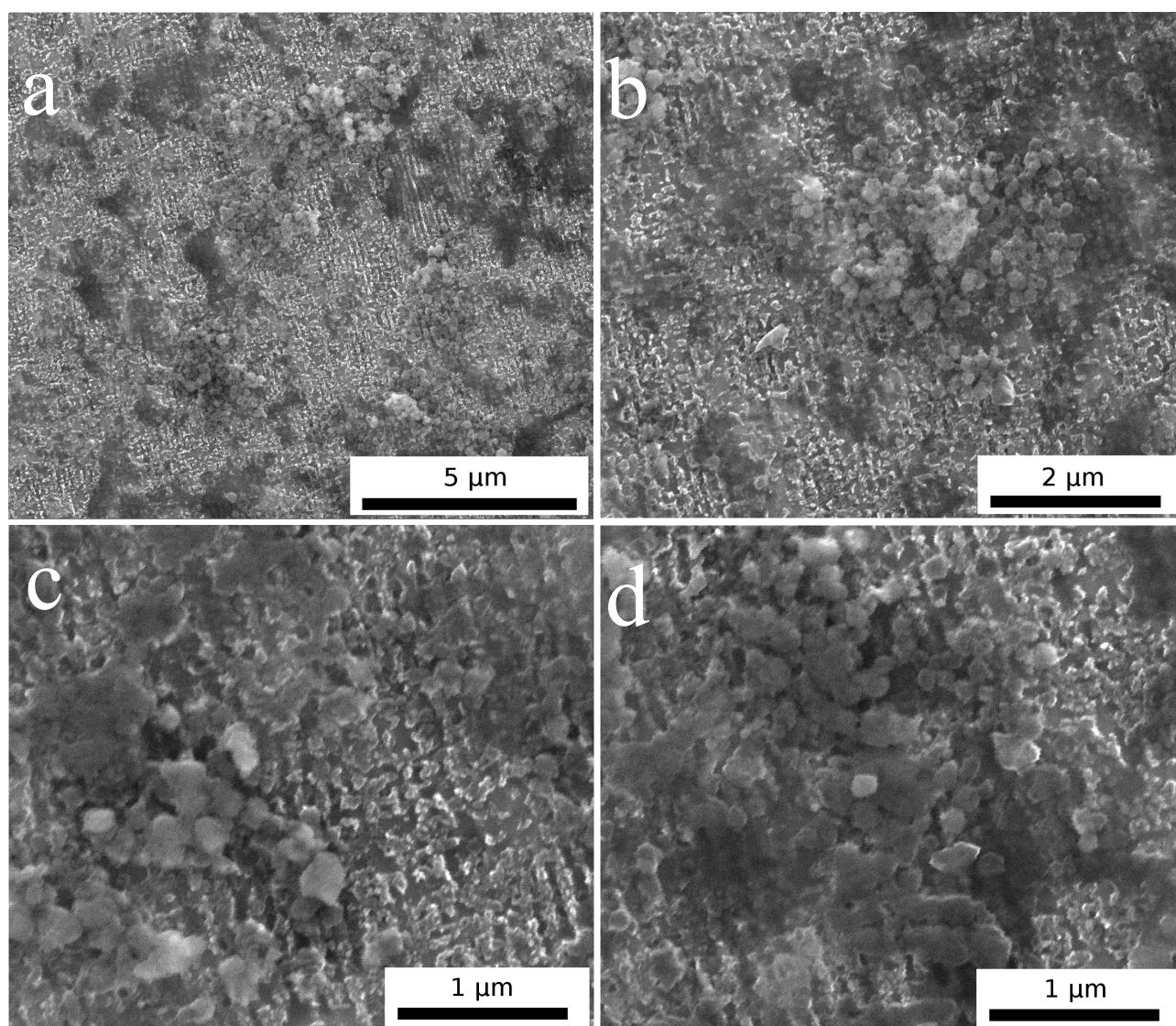


Abbildung 88: REM-Aufnahmen von PEI-Rhodamin-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln, abgeschieden auf einem nanostrukturierten Si-Wafer bei einer Mischspannung aus 5 V Gleichstrom und 10 V Wechselstrom für 30 s.

Abbildung 88 zeigt die PEI-Rhodamin funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Abscheidung auf einem nanostrukturierten Si-Wafer. Die Partikel sind sphärisch und haben einen Durchmesser von 100-300 nm. Die Partikel sind also größer als die mit normalem PEI funktionalisierten Partikel. Die DLS-Messung zeigt eine Aggregation der Nanopartikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von mehr als 1000 nm mit einem PDI von 1. Das Zetapotential ist mit +27 mV niedriger

als das Zetapotential der mit normalem PEI funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel (+38 mV). Dies ist möglicherweise ebenfalls auf die veränderte Synthesemethode zurückzuführen. In Abbildung 88a und b ist zu erkennen, dass sich während der Abscheidung größere Partikelaggregate gebildet haben.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse zur elektrophoretischen Beschichtung nanostrukturierter Si-Wafer mit Calciumphosphat-PEI-Nanopartikeln

Experiment	Abscheidenspannung	Abscheidezeit	Ergebnis
Beschichtung mit Gleichspannung	2 V DC bis 50 V DC	30 s, 60 s	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einfluss der Spannung auf die Dicke der Partikelschicht</li> <li>• Aggregation der Partikel in mehreren Schichten</li> <li>• Einfluss der Abscheidezeit auf die Größe der Partikelaggregate</li> </ul>
Entfernen der Partikel mit Ultraschall	50 V DC	30 s	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Partikel werden durch Ultraschall wieder von der Oberfläche entfernt</li> <li>• Keine Kontrolle über Menge der entfernten Partikel</li> </ul>
Entfernen der Partikel mit einer Gegenspannung	50 V DC	30 s	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keine Veränderung der Partikelschicht bei -50 V und 30 s</li> </ul>
Mischspannung	5 V DC + 10 V AC	30 s, 60 s	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bessere Lokalisierung der Partikel an den Nanostrukturen</li> <li>• unregelmäßige Verteilung</li> <li>• eine Lage Partikel</li> </ul>

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Dispersionstemperatur	10 V DC	30 s	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bei mittlerer Temperatur höhere Partikelmenge</li> <li>• Bessere Lokalisierung der Partikel an den Nanostrukturen</li> </ul>
Kombination Mischspannung und Dispersionstemperatur	5 V DC + 10 V AC	30 s	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erhöhte Partikelmenge</li> <li>• Inselbildung der Partikel</li> </ul>

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse zur elektrophoretischen Beschichtung noch einmal zusammengefasst.

### 4.3.9. Zusammenfassung

Si-Wafer können mit einem Laser mit Pulsdauern im Femtosekunden-Bereich nanostrukturiert werden. Die dadurch erzeugten *ripples* weisen eine Periodizität von ca. 100 nm auf. Die auf die Strukturierung folgende Reinigung des strukturierten Bereichs muss noch verbessert werden, da sich noch abgetragenes Material in den Strukturen befindet.

Um das Prinzip der elektrophoretischen Abscheidung in den Nanostrukturen zu verifizieren, wurden PVP-funktionalisierte Goldnanopartikel verwendet. Diese Partikel haben einen Durchmesser von 15 nm und sind damit deutlich kleiner als die Periodizität der *ripples*. Eine Abscheidung mit einer hohen Spannung zeigt, dass die Partikel durchaus in den Nanostrukturen abgeschieden werden können, aber auch zu einer Aggregation neigen.

Als Modellsystem für die bioaktiven Calciumphosphat-Nanopartikel wurden PEI-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel verwendet, die sich aufgrund ihrer

hohen Oberflächenladung gut abscheiden lassen. Der Einfluss der Abscheidespannung und -zeit auf die Partikelschicht wurde untersucht. Hier zeigt sich, dass die verwendete Spannung einen höheren Einfluss auf die Dicke der Schicht hat als die Abscheidezeit. Bei hohen Spannungen werden die Nanostrukturen von einer dicken Schicht Partikel komplett verdeckt. Durch das Verringern der Spannung werden weniger Partikel abgeschieden, diese verteilen sich aber unregelmäßig auf der Oberfläche und bilden Aggregate. Die Abscheidezeit hat demnach also einen Einfluss auf die Größe solcher Partikelaggregate. Durch das Verringern der Zeit werden die Aggregate kleiner.

Um bei einer dicken Schicht den Partikelüberschuss von der Oberfläche zu entfernen, wurden die Wafer im Anschluss an die Beschichtung im Ultraschallbad behandelt. Die Partikel können so wieder von der Oberfläche entfernt werden, allerdings ist die Kontrolle über die Menge der entfernten Partikel schwierig. Auch das Anlegen einer Gegenspannung, also die Umkehr der Stromrichtung, wurde verwendet, um die Partikel wieder von der Oberfläche zu entfernen. Auch bei hohen Spannungen konnten die Partikel nicht entfernt werden.

Durch die Verwendung einer Mischspannung für die Abscheidung kann eine bessere Orientierung der Partikel an den Nanostrukturen erreicht werden. Durch den Wechselspannungsanteil wird die Menge der abgeschiedenen Partikel verringert. Wahrscheinlich werden hier die schwach adsorbierten Partikel durch die Wechselspannung wieder von der Oberfläche abgetrennt. Dies führt dazu, dass die Partikel nicht mehr in mehreren Schichten abgeschieden werden. Eine gleichmäßige Verteilung der Partikel über den gesamten strukturierten Bereich wurde jedoch auch mit der Mischspannung nicht erreicht. Auch die Erhöhung der Dispersionstemperatur hat einen Effekt auf die Beschichtung. Bei mittlerer Temperatur werden durch die höhere kinetische Energie die schwach adsorbierten Partikel ebenfalls von der Si-Oberfläche gelöst, so dass sich eine gewisse Orientierung der abgeschiedenen Partikel an den Nanostruktu-

ren ergibt. Wird die Temperatur weiter erhöht, so werden insgesamt weniger Partikel abgeschieden, die kinetische Energie ist dann so hoch, dass auch die stärker gebundenen Partikel wieder von der Oberfläche gelöst werden. Die Kombination von Mischspannung und erhöhter Dispersionstemperatur führt zu einer erhöhten Menge abgeschiedener Partikel, die sich jedoch zu Inseln zusammenschließen und nicht gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt sind.

### 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Verwendungsmöglichkeiten von Calciumphosphat-Nanopartikeln aufgezeigt.

Durch den Einbau von Lanthaniden in Hydroxylapatit-Nanopartikel lassen sich fluoreszierende, biokompatible Nanopartikel darstellen. Solche Partikel sind schon in der Literatur beschrieben,<sup>[147-149]</sup> haben aber den Nachteil, dass sie im Vergleich mit anderen fluoreszierenden Molekülen oder Partikeln nur eine geringe Fluoreszenzintensität aufweisen. In dieser Arbeit wurden Möglichkeiten zur Steigerung der Fluoreszenzintensität untersucht. Die Hydroxylapatit-Nanopartikel wurden mit Europium, Terbium und Dysprosium dotiert, die alle Strahlung in unterschiedlichen Bereichen des sichtbaren Lichts emittieren. Durch die Co-Dotierung mit einem geeignetem Sensibilisator kann der Energietransfer auf die fluoreszierenden Lanthanid-Ionen verbessert werden, da diese Ionen zusätzlich Energie aufnehmen und auf die Lanthanid-Ionen transferieren können. Dabei muss die richtige Konzentration des Sensibilisators gefunden werden. Ein geringer Anteil des Sensibilisators verbessert den Energietransfer nur wenig, ist die Konzentration zu hoch, so wird die Fluoreszenz gelöscht. Eine weitere Möglichkeit ist die Erhöhung der Kristallinität der Nanopartikel. Da Nanopartikel eine geringe Kristallinität aufweisen, ist der Energietransfer in solchen Partikeln nicht effizient. Eine Steigerung der Kristallinität ist aber oft auch mit einem Partikelwachstum verbunden. Durch einen Hydrothermalprozess kann die Kristallinität der Partikel erhöht werden, ohne dass Größe signifikant verändert wird. Des weiteren wirkt sich die große spezifische Oberfläche der Nanopartikel negativ auf die Fluoreszenzintensität aus, es befinden sich auch viele Lanthanid-Ionen an der Oberfläche. Hier ist der Energietransfer nicht effizient, und die Fluoreszenz kann durch äußere Einflüsse, z. B. durch das Lösungsmittel, gelöscht werden. Das Quenching der Fluoreszenz durch äußere Einflüsse lässt sich durch die Ummantelung der Nanopartikel mit einer Schale verhindern. Durch eine Modifikation des Stöber-Prozesses lassen sich die Hydroxyla-

patit-Nanopartikel mit einer Silikatschale ummanteln. Dies sorgt für eine Steigerung der Fluoreszenzintensität. Um die Silikatschale an den Nanopartikeln anzubringen, musste allerdings ein kationisches Polymer verwendet werden, dass mit seinen Aminogruppen wiederum als Quencher wirkt, so dass die Fluoreszenzintensität, verglichen mit der Intensität nach dem Hydrothermalprozess, etwas geringer ist. Auch die Ummantelung mit einer Amino-funktionalisierten Silikatschale ist möglich, hier wirken die Aminogruppen der Schale allerdings ebenfalls als Quencher.

Calciumphosphat-Nanopartikel werden als Trägersysteme für die Zelltransfektion eingesetzt.<sup>[150-154]</sup> Die Charakterisierung dieses Systems zeigt, dass für die Stabilisierung der Partikel ein Überschuss an DNA benötigt wird. Die maximale Menge DNA, die an der Partikeloberfläche adsorbiert werden kann, reicht nicht aus, um die Aggregation der Partikel zu verhindern. Erst ein Überschuss an DNA stabilisiert die Dispersion über einen längeren Zeitraum. Dadurch ist unklar, wie viel DNA bei der Transfektion über die Nanopartikel tatsächlich in die Zelle transportiert wird.

Auch zur elektrophoretischen Beschichtung eignen sich Calciumphosphat-Nanopartikel. Es wurde versucht, nanostrukturierte Si-Wafer elektrophoretisch mit Calciumphosphat-Nanopartikeln zu beschichten. Die Reaktion von Zellen auf optisch erzeugte, bioaktive Oberflächen wurde bisher noch nicht untersucht. Die Faktoren, die die Menge der abgeschiedenen Partikel beeinflussen, wurden untersucht. Die Abscheidespannung hat einen großen Einfluss auf die Schichtdicke. Bei niedrigen Spannungen zeigt sich eine ungleichmäßige Verteilung der Partikel auf der Oberfläche. Die Abscheidezeit hat einen geringen Einfluss auf die Menge der abgeschiedenen Partikel, beeinflusst aber die Größe der Aggregate. Durch die Verwendung einer Mischspannung wurde eine gewisse Positionierung der Partikel in den Nanostrukturen erreicht, weil die schwach gebundenen Partikel wieder von der Oberfläche abgestoßen werden. Auch die Erhöhung der Dispersionstemperatur hat einen positiven Einfluss auf die abgeschiedene Schicht. Wird die Temperatur allerdings zu weit erhöht, wer-



den weniger Partikel auf der Oberfläche abgeschieden. Eine Kombination aus Mischspannung und erhöhter Dispersionstemperatur führt dazu, dass sich die Partikel auf der Oberfläche zu Inseln zusammenschließen.

## 6. Literatur

- [1] K. J. Moon, J. H. Choi, T. I. Lee, M. H. Ham, W. J. Maeng, I. Hwang, H. Kim, J. M. Myoung, *Microelectron. Eng.* **2010**, 87, 2407.
- [2] J. S. Lee, *Gold Bull.* **2010**, 43, 189.
- [3] M. Ahmadi, N. Phonthammachai, T. H. Shuan, T. J. White, N. Mathews, S. G. Mhaisalkar, *Org. Electron.* **2010**, 11, 1660.
- [4] A. O. T. Patrocínio, L. G. Paterno, N. Y. M. Iha, *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 17954.
- [5] S. Gimenez, T. Lana-Villarreal, R. Gomez, S. Agouram, V. Munoz-Sanjose, I. Mora-Sero, *J. Appl. Phys.* **2010**, 108.
- [6] H. W. Geng, R. X. Peng, S. K. Han, X. H. Gu, M. T. Wang, *J. Electron. Mater.* **2010**, 39, 2346.
- [7] A. K. Rath, S. Bhaumik, A. J. Pal, *Appl. Phys. Lett.* **2010**, 97.
- [8] P. Uthirakumar, B. D. Ryu, J. H. Kang, H. G. Kim, J. H. Ryu, C. H. Hong, *Vacuum* **2010**, 85, 198.
- [9] Z. Liu, F. Kiessling, J. Gätjens, *J. Nanomater.* **2010**, 894303.
- [10] G. Couston, S. Esnouf, T. Gacoin, J.-P. Boilot, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 20021.
- [11] C. D. Geddes, A. Parfenov, I. Gryczynski, J. R. Lakowicz, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 9989.
- [12] A. J. Ramsay, *Semicond. Sci. Technol.* **2010**, 25, 103001.
- [13] P. C. Ray, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 5332.
- [14] T. Hofmann, *Chem. unserer Zeit* **2004**, 38, 24.
- [15] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie, 3. Auflage*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [16] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2002**.
- [17] R. M. Fitch, *Polymer Colloids*, Academic Press, San Diego, **1997**.

- [18] *Zetasizer user manual*, Malvern Instruments.
- [19] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie, 2. Auflage*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [20] D. Axelrod, M. P. Klein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, *57*, 927.
- [21] J. Y. Chane-Ching, A. Lebugle, I. Rousselot, A. Pourpoint, F. Pellé, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 2904.
- [22] D. L. Nida, M. S. Rahman, K. D. Carlson, R. Richards-Kortum, M. Follen, *Gynecol. Oncol.* **2005**, *99*, S89.
- [23] V. Buissette, D. Giaume, T. Gacoin, J.-P. Boilot, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 529.
- [24] A. Doat, F. Pellé, N. Gardant, A. Lebugle, *J. Solid State Chem.* **2004**, *177*, 1179.
- [25] B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, M. G. Bawendi, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 9463.
- [26] A. R. Kortan, R. Hull, R. L. Opila, M. G. Bawendi, M. L. Steigerwald, P. J. Carroll, L. E. Brus, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1327.
- [27] M. Haurylau, J. Zhang, S. M. Weiss, P. M. Fauchet, D. V. Martyshev, V. I. Rupasov, S. G. Krivoshlykov, *J. Photochem. Photobiol. A* **2006**, *183*, 329.
- [28] Y. S. Wang, P. J. Thomas, P. O'Brien, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 21412.
- [29] N. Y. Gordeev, Novikov, II, A. M. Kuznetsov, Y. M. Shernyakov, M. V. Maximov, A. E. Zhukov, A. V. Chunareva, A. S. Payusov, D. A. Livshits, A. R. Kovsh, *Semiconductors* **2010**, *44*, 1357.
- [30] A. F. Tsatsul'nikov, E. E. Zavarin, N. V. Kryzhanovskaya, W. V. Lundin, A. V. Saharov, S. O. Usov, P. N. Brunkov, V. V. Goncharov, N. A. Cherkashin, M. Hytch, *Semiconductors* **2010**, *44*, 1338.
- [31] E. S. Shatalina, S. A. Blokhin, A. M. Nadtochy, A. S. Payusov, A. V. Savelyev, M. V. Maximov, A. E. Zhukov, N. N. Ledentsov, A. R. Kovsh, S. S. Mikhrin, V. M. Ustinov, *Semiconductors* **2010**, *44*, 1308.
- [32] P. A. Frantsuzov, R. A. Marcus, *Phys. Rev. B* **2005**, *72*, 1.

- [33] R. Dafinova, V. Pelova, *J. Mater. Sci. Lett.* **1995**, *14*, 1414.
- [34] E. G. Moore, A. P. S. Samuel, K. N. Raymond, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 542.
- [35] O. Lehmann, Dissertation thesis, Universität Hamburg (Hamburg), **2005**.
- [36] S. I. Klink, G. A. Hebbink, L. Grave, F. G. A. Peters, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, J. W. Hofstraat, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1923.
- [37] F. S. Richardson, *Chem. Rev.* **1982**, *82*, 541.
- [38] C. Capuccini, P. Torricelli, E. Boanini, M. Gazzano, R. Giardino, A. Bigi, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2008**, 594.
- [39] S. V. Dorozhkin, M. Epple, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3260.
- [40] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, M. J. Glimcher, *Osteoporos. Int.* **2009**, *20*, 1013.
- [41] Z. Si, G. Zhu, J. Hu, B. Zhang, W. Jiang, W. Ai, *Anal. Lett.* **1994**, *27*, 1183.
- [42] S. C. J. Loo, Y. E. Siew, S. Ho, F. Y. C. Boey, J. Ma, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2008**, *19*, 1389.
- [43] K. Binnemans, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4283.
- [44] M. D. Seltzer, A. O. Wright, C. A. Morrison, D. E. Wortman, J. B. Gruber, E. D. Filer, *J. Phys. Chem. Solids* **1996**, *57*, 1175.
- [45] J. Jiménez, S. Lysenko, H. Liu, *J. Mater. Sci.* **2010**, *45*, 2983.
- [46] K. Riwotzki, M. Haase, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 10129.
- [47] E. Butter, I. Kolowos, H. Holzapfel, *Talanta* **1968**, *15*, 901.
- [48] V. K. Rai, S. B. Rai, D. K. Rai, *Opt. Commun.* **2006**, *257*, 112.
- [49] K. Kömpe, H. Borchert, J. Storz, A. Lobo, S. Adam, T. Möller, M. Haase, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5513.
- [50] K. Kömpe, O. Lehmann, M. Haase, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 4442.
- [51] F. Vetrone, R. Naccache, V. Mahalingam, C. G. Morgan, J. A. Capobianco, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 2924.
- [52] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62.

- [53] C. Fernandez-Lopez, C. Mateo-Mateo, R. A. Alvarez-Puebla, J. Perez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzan, *Langmuir* **2009**, 25, 13894.
- [54] S. R. Hall, S. A. Davis, S. Mann, *Langmuir* **2000**, 16, 1454.
- [55] Y. Kobayashi, H. Kakinuma, D. Nagao, Y. Ando, T. Miyazaki, M. Konno, *J. Nanopart. Res.* **2009**, 11, 1787.
- [56] J. Zhang, A. Thurber, C. Hanna, A. Punnoose, *Langmuir* **2009**, 26, 5273.
- [57] Q. Wang, X. Chen, L. Tao, L. Wang, D. Xiao, X. Q. Yu, L. Pu, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 97.
- [58] R. Yang, F. Wang, R. H. Blunk, A. P. Angelopoulos, *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, 349, 148.
- [59] D. W. Kim, I.-S. Cho, J. Y. Kim, H. L. Jang, G. S. Han, H.-S. Ryu, H. Shin, H. S. Jung, H. Kim, K. S. Hong, *Langmuir* **2009**, 26, 384.
- [60] F. D. Bushman, *J. Clin. Invest.* **2007**, 117, 2083.
- [61] H. Hioki, H. Kameda, H. Nakamura, T. Okunomiya, K. Ohira, K. Nakamura, M. Kuroda, T. Furuta, T. Kaneko, *Gene Ther.* **2007**, 14, 872.
- [62] T. Iwakuma, Y. Cui, L. J. Chang, *Virology* **1999**, 261, 120.
- [63] J. Jakobsson, T. T. Nielsen, K. Staflin, B. Georgievskia, C. Lundberg, *Gene Ther.* **2006**, 13, 966.
- [64] T. Kafri, *Methods Mol. Biol.* **2004**, 246, 367.
- [65] N. Miyagi, V. P. Rao, D. Ricci, Z. J. Du, G. W. Byrne, K. R. Bailey, H. Nakai, S. J. Russell, C. G. A. McGregor, *J. Heart Lung Transpl.* **2008**, 27, 554.
- [66] U. Modlich, J. Bohne, M. Schmidt, C. von Kalle, S. Knoss, A. Schambach, C. Baum, *Blood* **2006**, 108, 2545.
- [67] Y. Yi, S. H. Hahm, K. H. Lee, *Curr. Gene Ther.* **2005**, 5, 25.
- [68] M. Breunig, U. Lungwitz, R. Liebl, A. Goepferich, *PNAS* **2007**, 104, 14454.
- [69] A. Elouahabi, J.-M. Ruysschaert, *Mol. Ther.* **2005**, 11, 336.
- [70] L. Hu, Z. Mao, C. Gao, *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 3108.

- [71] C. M. Wiethoff, C. R. Middaugh, *J. Pharm. Sci.* **2003**, 92, 203.
- [72] C. Gan, *Scientist* **1989**, 3, 25.
- [73] S. Watts, *New Sci.* **1990**, 127, 34.
- [74] A. Iida, M. Seki, M. Kamada, Y. Yamada, H. Morikawa, *Theor. Appl. Gen.* **1990**, 80, 813.
- [75] V. Sokolova, M. Epple, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 1402.
- [76] A. Akinc, M. Thomas, A. M. Klibanov, R. Langer, *J. Gene Med.* **2005**, 7, 657.
- [77] N. Sieverling, Dissertation thesis, Universität Potsdam (Golm), **2005**.
- [78] I. Roy, S. Mitra, A. Maitra, S. Mozumdar, *Int. J. Pharm.* **2003**, 250, 25.
- [79] R. Singh, A. Saxena, S. Mozumdar, *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **2008**, 5, 1.
- [80] V. Sokolova, A. Kovtun, O. Prymak, W. Meyer-Zaika, E. A. Kubareva, E. A. Romanova, T. S. Oretskaya, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2007**, 17, 721.
- [81] V. Sokolova, I. Radtke, R. Heumann, M. Epple, *Biomaterials* **2006**, 27, 3147.
- [82] Y. Cai, R. Tang, *J. Mater. Chem.* **2008**, 18, 3775.
- [83] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, A. Lebugle, H. Sfihi, A. Barroug, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **2007**, 38, 996.
- [84] Y. Zhao, Y. Zhang, F. Ning, D. Guo, Z. Xu, *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **2007**, 121.
- [85] D. Luo, W. M. Saltzman, *Nat. Biotech.* **2000**, 18, 33.
- [86] S. S. Bale, S. J. Kwon, D. A. Shah, A. Banerjee, J. S. Dordick, R. S. Kane, *ACS Nano* **2010**, 4, 1493.
- [87] S. Neumann, A. Kovtun, I. D. Dietzel, M. Epple, R. Heumann, *Biomaterials* **2009**, 30, 6794.
- [88] J. T. Keer, L. Birch, *Essentials of Nucleic Acid Analysis*, RSC Publishing, Cambridge, **2008**.

- [89] K. B. McGowan, M. S. Kurtis, L. M. Lottman, D. Watson, R. L. Sah, *Osteoarthritis and Cartilage* **2002**, 10, 580.
- [90] H. J. Junge, *Dissertation*, Philipps-Universität, Marburg, **2003**.
- [91] R. L. Sammons, N. Lumbikanonda, M. Gross, P. Cantzler, *Clin. Oral Impl. Res.* **2005**, 16, 657.
- [92] Y. Hu, K. Cai, Z. Luo, R. Zhang, L. Yang, L. Deng, K. D. Jandt, *Biomaterials* **2009**, 30, 3626.
- [93] X. Lu, Y. Leng, *J. Biomed. Mater. Res.* **2003**, 66A, 677.
- [94] K. Matsuzaka, M. Yoshinari, M. Shimono, T. Inoue, *J. Biomed. Mater. Res.* **2004**, 68A, 227.
- [95] J. H. C. Wang, E. S. Grood, J. Florer, R. Wenstrup, *J. Biomech.* **2000**, 33, 729.
- [96] J. Reichert, S. Brukner, H. Bartelt, K. D. Jandt, *Adv. Eng. Mater.* **2007**, 9, 1104.
- [97] J. Y. Park, C. H. Gemmell, J. E. Davies, *Biomaterials* **2001**, 22, 2671.
- [98] T. Ogawa, I. Nishimura, *J. Dent. Res.* **2006**, 85, 566.
- [99] J. E. Ellingsen, C. B. Johansson, A. Wennerberg, A. Holmen, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **2004**, 19, 659.
- [100] L. G. Gutwein, T. J. Webster, *Biomaterials* **2004**, 25, 4175.
- [101] W. Q. Yu, Y. L. Zhang, X. Q. Jiang, F. Q. Zhang, *Oral Dis.* **2010**, 16, 624.
- [102] V. C. Mendes, R. Moineddin, J. E. Davies, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2009**, 90A, 577.
- [103] A. Lin, C. J. Wang, J. Kelly, P. Gubbi, I. Nishimura, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **2009**, 24, 808.
- [104] M. J. Dalby, M. O. Riehle, H. J. H. Johnstone, S. Affrossman, A. S. G. Curtis, *Tissue Eng.* **2002**, 8, 1099.
- [105] K. R. Milner, C. A. Siedlecki, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2007**, 82A, 80.

- [106] C. A. Mills, E. Martinez, A. Errachid, E. Engel, M. Funes, C. Moormann, T. Wahlbrink, G. Gomilal, J. Plane, J. Samitier, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2007**, 7, 4588.
- [107] G. Mendonça, D. B. S. Mendonça, F. J. L. Aragão, L. F. Cooper, *Biomaterials* **2008**, 29, 3822.
- [108] E. Martinez, A. Lagunas, C. A. Mills, S. Rodriguez-Segui, M. Estevez, S. Oberhansl, J. Comelles, J. Samitier, *Nanomedicine* **2009**, 4, 65.
- [109] M. Mrksich, *Acta Biomater.* **2009**, 5, 832.
- [110] M. Frasconi, F. Mazzei, T. Ferri, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 398, 1545.
- [111] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1103.
- [112] F. H. Chang, C. H. Lee, M. T. Chen, C. C. Kuo, Y. L. Chiang, C. Y. Hang, S. Roffler, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, e33.
- [113] Y.-C. Huang, K. Riddle, K. G. Rice, D. J. Mooney, *Hum. Gene Ther.* **2005**, 16, 609.
- [114] J.-H. Jang, T. L. Houchin, L. D. Shea, *Expert Rev. Med. Devices* **2004**, 1, 127.
- [115] B. D. Klugherz, P. L. Jones, X. Cui, W. Chen, N. F. Meneveau, S. DeFelice, J. Connolly, R. L. Wilensky, R. J. Levy, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 1181.
- [116] M. Sato, T. J. Webster, *Expert Rev. Med. Devices* **2004**, 1, 105.
- [117] C.-H. K. Wang, S. Jiang, S. H. Pun, *Langmuir* **2010**, 26, 15445.
- [118] Z. Bengali, A. K. Pannier, T. Segura, B. C. Anderson, J. H. Jang, T. A. Mustoe, L. D. Shea, *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, 90, 290.
- [119] A. K. Pannier, B. C. Anderson, L. D. Shea, *Acta Biomater.* **2005**, 1, 511.
- [120] G. Y. Wu, C. H. Wu, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 4429.
- [121] D. Gil, T. A. Brunner, C. Fonseca, N. Seong, B. Streefkerk, C. Wagner, M. Stavenga, *J. Vac. Sci. Technol. B* **2004**, 22, 3431.



- [122] M. Rothschild, T. M. Bloomstein, R. R. Kunz, V. Liberman, M. Switkes, S. T. Palmacci, J. H. C. Sedlacek, D. Hardy, A. Grenville, *J. Vac. Sci. Technol. B* **2004**, 22, 2877.
- [123] C. G. Willson, B. C. Trinquet, *J. Photopolym. Sci. Technol.* **2003**, 16, 621.
- [124] T. Ito, S. Okazaki, *Nature* **2000**, 406, 1027.
- [125] T. A. Brunner, *J. Vac. Sci. Technol. B* **2003**, 21, 2632.
- [126] G. M. Wallraff, W. D. Hinsberg, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 1801.
- [127] M. Shinoda, R. R. Gattass, E. Mazur, *J. Appl. Phys.* **2009**, 105.
- [128] B. H. Yu, P. X. Lu, N. L. Dai, Y. H. Li, X. L. Wang, Y. Wang, Q. G. Zheng, *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* **2008**, 10.
- [129] J. Bonse, A. Rosenfeld, J. Kruger, *J. Appl. Phys.* **2009**, 106.
- [130] Z. Guosheng, P. M. Fauchet, A. E. Siegman, *Phys. Rev. B* **1982**, 26, 5366.
- [131] D. C. Emmony, R. P. Howson, L. J. Willis, *Appl. Phys. Lett.* **1973**, 23, 598.
- [132] J. E. Sipe, J. F. Young, J. S. Preston, H. M. van Driel, *Phys. Rev. B* **1983**, 27, 1141.
- [133] H. M. van Driel, J. E. Sipe, J. F. Young, *Phys. Rev. Lett.* **1982**, 49, 1955.
- [134] Q. H. Wu, Y. R. Ma, R. C. Fang, Y. Liao, Q. X. Yu, X. L. Chen, K. Wang, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, 82, 1703.
- [135] J. Bonse, M. Munz, H. Sturm, *J. Appl. Phys.* **2005**, 97, 013538.
- [136] T. Q. Jia, H. X. Chen, M. Huang, F. L. Zhao, J. R. Qiu, R. X. Li, Z. Z. Xu, X. K. He, J. Zhang, H. Kuroda, *Phys. Rev. B* **2005**, 72, 125429.
- [137] A. Borowiec, H. K. Haugen, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, 82, 4462.
- [138] G. Miyaji, K. Miyazaki, *Opt. Express* **2008**, 16, 16265.
- [139] G. Martsinovskii, G. Shandybina, D. Smirnov, S. Zaboltnov, L. Golovan, V. Timoshenko, P. Kashkarov, *Opt. Spectrosc.* **2008**, 105, 67.
- [140] J. Reif, F. Costache, M. Henyk, S. V. Pandelov, *Appl. Surf. Sci.* **2002**, 197, 891.

- [141] R. Le Harzic, D. Dörr, D. Sauer, M. Neumeier, M. Epple, H. Zimmermann, F. Stracke, *Opt. Lett.*, *accepted*.
- [142] H. Urch, Dissertation thesis, Universität Duisburg-Essen (Essen), **2008**.
- [143] Z.-Z. Lu, J. Wu, T.-M. Sun, J. Ji, L.-F. Yan, J. Wang, *Biomaterials* **2008**, *29*, 733.
- [144] C. V. Bindhu, S. S. Harilal, V. P. N. Nampoori, C. P. G. Vallabhan, *Pramana-J. Phys.* **1999**, *52*, 435.
- [145] F. L. Arbeloa, P. R. Ojeda, I. L. Arbeloa, *J. Lumin.* **1989**, *44*, 105.
- [146] D. Setiawan, A. Kazaryan, M. A. Martoprawiro, M. Filatov, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 11238.
- [147] O. A. Graeve, R. Kanakala, A. Madadi, B. C. Williams, K. C. Glass, *Biomaterials* **2010**, *31*, 4259.
- [148] A. Lebugle, F. Pellé, C. Charvillat, I. Rousselot, J. Y. Chane-Ching, *Chem. Commun.* **2006**, 606.
- [149] S. Padilla Mondéjar, A. Kovtun, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 4153.
- [150] A. Hanifi, M. H. Fathi, H. M. M. Sadeghi, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2010**, *21*, 2601.
- [151] A. Hanifi, M. H. Fathi, H. M. M. Sadeghi, J. Varshosaz, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2010**, *21*, 2393.
- [152] J. Klesing, S. Chernousova, A. Kovtun, S. Neumann, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 6144.
- [153] V. Sokolova, S. Neumann, A. Kovtun, S. Chernousova, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Sci.* **2010**, *45*, 4952.
- [154] G. J. Wu, L. Z. Zhou, K. W. Wang, F. Chen, Y. Sun, Y. R. Duan, Y. J. Zhu, H. C. Gu, *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *345*, 427.

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDX	Energiedispersive Röntgenanalyse
HSFL	<i>high spatial frequency</i> LIPSS
ICDD	<i>International Centre for diffraction data</i>
IR	Infrarot
LED	<i>light emitting diode</i>
LIPSS	<i>laser-induced periodic surface structures</i>
LSFL	<i>low spatial frequency</i> LIPSS
PDI	Polydispersitätsindex
PEI	Polyethylenimin
PLL	Poly- <i>l</i> -lysin
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVP	Polyvinylpyrrolidon
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEOS	Tetraethylorthosilikat
SAM	<i>self-assembled monolayer</i>
UV	Ultraviolett
XRD	Röntgenpulverdiffraktometrie

## 7.2. Publikationsliste

### Reguläre Publikationen in referierten wissenschaftlichen Fachzeitschriften

Manuel Neumeier, Lauren A. Hails, Sean A. Davis, Stephen Mann, and Matthias Eppe, *Synthesis of fluorescent core-shell nanoparticles*, J. Mater. Chem. 21 (2011) 1250.

Manuel Neumeier, Daniel Dörr, Ronan LeHarzic, Daniel Sauer, Frank Stracke, Heiko Zimmermann, and Matthias Eppe, *Electrophoretic deposition of calciumphosphate nanoparticles on a nanostructured silicon surface*, Materialwiss. u. Werkstofftech. 42 (2011) 50.

R. LeHarzic, D. Dörr, D. Sauer, M. Neumeier, M. Eppe, H. Zimmermann and F. Stracke, *Large area uniform high spatial frequency ripples performed on silicon using nanojoule femtosecond laser pulses at high repetition rate*, Opt. Lett. 36 (2011) 229.

### Sonstige Publikationen, Kurzbeiträge, zitierfähige Konferenzbeiträge (*other publications*)

S. Padilla Mondejar, A. Kovtun, M. Neumeier, S. Neumann, R. Heumann, M. Eppe, *Biokompatible fluoreszierende Calciumphosphat-Nanopartikel zur Transfektion von Zellen*, Biomaterialien 8 (2007) 154.

A. Kovtun, H. Urch, M. Neumeier, S. Neumann, R. Heumann, M. Köller, M. Eppe, *Transfizierende Metalloberflächen*, Biomaterialien 9 (2008) 128.

M. Neumeier, D. Dörr, R. LeHarzic, D. Sauer, F. Stracke, H. Zimmermann, M. Epple, *Elektrophoretische Beschichtung von nanostrukturierten Oberflächen mit Calciumphosphat-Nanopartikeln*, Biomaterialien 11 (2010) 183.

### **Wissenschaftliche Vorträge (P=Poster, V=Vortrag)**

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e. V. (DGBM), Hannover, 22.11.-24.11.2007, S. Padilla Mondejar, A. Kovtun, M. Neumeier, S. Neumann, R. Heumann, M. Epple, “*Biokompatible fluoreszierende Calciumphosphat-Nanopartikel zur Transfektion von Zellen*” (V)

World Biomaterials Congress, Amsterdam, 28.5.-1.6.2008, A. Kovtun, M. Neumeier, S. Padilla Mondejar, R. Heumann, M. Epple, “*Synthesis of fluorescent calcium phosphate nanoparticles and their tracking in cell culture*” (P)

German-Ukrainian Symposium on Nanoscience and Nanotechnology, Essen, 22.9.-25.9.2008, Manuel Neumeier, Matthias Epple, “*The effect of  $Y^{3+}$  on the fluorescence intensity of europium-doped calcium phosphate nanoparticles*” (P)

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e. V. (DGBM), Hamburg, 20.11.-22.11.2008, A. Kovtun, H. Urch, M. Neumeier, S. Neumann, R. Heumann, M. Köller, M. Epple, “*Transfizierende Metalloberflächen*” (V)

2009 MRS Spring Meeting, San Francisco, 13.04.-17.04.2009, A. Kovtun, S. Neumann, M. Neumeier, H. Urch, R. Heumann, M. Köller, M. Epple, “*Nanoparticle-mediated gene transfer from metal surfaces*” (P)

22<sup>nd</sup> European Conference on Biomaterials, Lausanne, 07.-11.09.2009, A. Kovtun, S. Neumann, M. Neumeier, H. Urch, R. Heumann, M. Köller, M. Eppe, “*Local gene transfer from nanoparticle-loaded titanium surfaces*” (V)

44. Jahrestagung der Deutschen Kolloidgesellschaft, 28.-30.09.2009, Hamburg, M. Eppe, A. Kovtun, V. Sokolova, J. Klesing, M. Neumeier, S. Neumann, R. Heumann, “*Colloidal dispersions of calcium phosphate nanoparticles functionalized with nucleic acids for gene transfer into living cells*” (V)

2009 MRS Fall Meeting, Boston, 30.11-4.12.2009, Anna Kovtun, Sebastian Neumann, Manuel Neumeier, Henning Urch, Manfred Köller, Rolf Heumann, Matthias Eppe, “*Transfection of cells from nanoparticle-functionalized metal surfaces*” (P)

Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology, Beregove 6.9.-10.9.2010, M. Neumeier, D. Dörr, R. LeHarzic, D. Sauer, F. Stracke, H. Zimmermann, and M. Eppe, “*Electrophoretic deposition of calciumphosphate nanoparticles on a nanostructured silicon surface*” (V)

3<sup>rd</sup> IRUN Symposium on Nanotechnology, Barcelona, 14.10.-15.10.2010, M. Neumeier, L. A. Hails, S. A. Davis, S. Mann, M. Eppe, “*Synthesis of fluorescent core-shell nanoparticles*” (V)

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e. V. (DGBM), Heilbad Heiligenstadt, 18.11.-20.11.2010, M. Neumeier, D. Dörr, R. LeHarzic, D. Sauer, F. Stracke, H. Zimmermann, M. Eppe, “*Elektrophoretische Beschichtung von nanostrukturierten Oberflächen mit Calciumphosphat-Nanopartikeln*” (P)

### 7.3. Lebenslauf

#### Persönliche Daten

Name	Manuel Neumeier
Geburtsdatum	10.07.1980
Geburtsort	Lübeck, Schleswig-Holstein
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

#### Berufserfahrung

03/2008-12/2010	Promotion an der Universität Duisburg-Essen
-----------------	---

#### Auslandsaufenthalte

05/2008	Forschungsaufenthalt an der Universität Bologna im Arbeitskreis Prof. Dr. A. Bigi (DAAD-Austauschprogramm)
10/2008	Forschungsaufenthalt an der Universität Madrid im Arbeitskreis Prof. Dr. M. Vallet-Regi (DAAD-Austauschprogramm)
05/2009-08/2009, 07/2010-08/2010	Forschungsaufenthalte an der Universität Bristol im Arbeitskreis Prof. Dr. S. Mann (DAAD-Austauschprogramm)

#### Studium

10/2001	Beginn des Studiums an der Universität Essen
05/2005	Vordiplom
07/2007-01/2008	Anfertigung der Diplomarbeit im Lehrstuhl für Anorganische Chemie bei Prof. Dr. M. Epple
01/2008	Abschluss als Diplom-Chemiker

#### Wehrdienst/Zivildienst

07/2000-05/2001	Wehrdienst als Ordonnanz im Offiziersheim
-----------------	---

#### Weiterer Bildungsweg

1991-2000	Gymnasium Rheinkamp, Moers, Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
1989-1991	Städtische Gemeinschaftsgrundschule Repelen, Moers
1987-1989	Grund- und Hauptschule Roter Hahn, Lübeck

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel

*„Calciumphosphat-Nanopartikel als fluoreszierendes Material  
und zur elektrophoretischen Beschichtung nanostrukturierter Oberflächen“*

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet zu haben.

Zudem erkläre ich, dass ich die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Essen,

Manuel Neumeier



## **Danksagung**

Ich danke,

Prof. Dr. Matthias Epple für die Überlassung der interessanten Themen und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit,

Prof. Dr. Axel Schönbucher für die Übernahme des Koreferats,

meinen Kooperationspartnern am Fraunhofer-Institut IBMT, insbesondere Prof. Dr. Heiko Zimmermann und Dr. Frank Stracke für die vielen Ideen zur elektrophoretischen Beschichtung der nanostrukturierten Si-Wafer und M. Eng. Daniel Dörr für die Bereitstellung der nanostrukturierten Si-Wafer,

Prof. Stephen Mann und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Sean Davis und Dr. Lauren Hails für die freundliche Aufnahme und die Ideen zur Ummantelung von Lanthanoid-dotierten Hydroxylapatit-Nanopartikeln während meiner Aufenthalte an der Universität Bristol,

Frau Carola Fischer für die Unterstützung in allen technischen Belangen und die Anfertigung diverser Geräte,

Dipl.-Chem. Jan Klesing für die Durchsicht dieser Arbeit und seine großartigen Geschichten, die zur allgemeinen Erheiterung beigetragen haben,

Dr. Stefanie Kittler für die Durchsicht dieser Arbeit und für ihre „Normalität“ im Labor,

## Danksagung

---

Dipl.-Chem. Simon Ristig für die Gesellschaft und viele fachliche und nicht-fachliche Gespräche während der Raucherpausen,

Dr. Thomas Annen für die Durchsicht dieser Arbeit und für viele kleine Dinge, deren Aufzählung diesen Rahmen sprengen würde,

Dipl.-Chem. Paulina Kaempfe für die gemeinsame Zeit auf engstem Raum, das stillschweigende Hinnehmen meiner musikalischen Ausschweifungen und die gute Freundschaft, die sich über die Jahre entwickelt hat,

meiner Familie, insbesondere meiner Frau Sandra für die Unterstützung während meiner Studienzeit und das stillschweigende Hinnehmen meiner Launen während der Anfertigung dieser Arbeit.